

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LAIR GABRIEL DA ROSA E SILVA

"Análise crítica do método de produção "*in vitro*" e transferência de embriões bovinos a partir de oócitos captados "*in vivo*" e maturados em meio comercial e meios patenteados".

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Luiz Augusto Casulari Roxo da Motta

BRASÍLIA

2013

LAIR GABRIEL DA ROSA E SILVA

"Análise crítica do método de produção "*in vitro*" e transferência de embriões bovinos a partir de oócitos captados "*in vivo*" e maturados em meio comercial e meios patenteados".

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 15/08/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Augusto Casulari Roxo da Motta (Presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Loise Pedrosa Salles
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Angélica Amorim Amato
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho a minha pequena grande família.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora, pela vida e proteção, presença constante em minha vida guiando meu caminho, aumentando a minha fé para seguir com perseverança.

Aos meus familiares, em especial meus pais que sempre me apoiam, incentivam e torcem pelo meu êxito.

Aos meus filhos, Pedro Vítor, João Gabriel e Maria Isabel. A presença e a alegria de tê-los comigo foi fundamental para a realização deste sonho.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Casulari Roxo da Motta, pela sua disposição, por ser responsável pelo meu aprendizado e por ter me aceito como seu aluno. Obrigado por acreditar em mim e no meu trabalho.

À todos do Laboratório para Estudo da Reprodução, pela convivência, amizade e ensinamentos.

A Laura pela participação nos experimentos e colaboração, obrigado por tudo!

A Dany Cris, pela amizade, carinho, atenção, lealdade e carisma, sempre nos auxiliando e disposta a colaborar, sem a sua participação nada seria feito.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, por toda atenção dispensada;

Aos proprietários e funcionários dos matadouros que cederam os ovários para a realização deste trabalho.

À UnB, FAPDF, PRONEX, CNPq e CAPES.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer).

RESUMO

A técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) refere-se a uma série de procedimentos *in vitro*, maturação (MIV), fertilização (FIV) e cultura do zigoto (CIV), necessárias para produzir embriões a partir de oócitos imaturos. Para avaliar a viabilidade e a competência do embrião é evidente que a transferência deste para fêmea receptora (TE) e a análise do neonato é o que vai definir a real efetividade dos processos de PIVE. O nosso objetivo é a montagem e padronização das técnicas de PIVE e TE, validação das técnicas *in vitro* pela produção de embriões provenientes de oócitos captados por aspiração folicular e maturados em meio TCM-199; e oócitos de matadouro maturados em meios testes de α -MEM e controle comercial. Em busca de melhores condições de cultura e de um sistema *in vitro* que fosse menos variável e, ao mesmo tempo, que simulasse a maturação do oócito observada no animal *in vivo*, desenvolvemos vários sistemas de cultura para a MIV, nos quais meios definidos foram formulados, testados e alguns patenteados. Os meios foram: α -MEMC, α -MEMB e α -MEMO. O primeiro meio, mais complexo, utiliza hormônios e agentes oxidantes, o segundo meio, não contém hormônios e o terceiro é composto pelo diluente. Ao serem comparados com o meio controle TCM-199, inibiram a maturação nuclear, produziram menor grau de poliespermia (α -MEMC), produziram a mesma porcentagem de embriões. FSH de suíno foi usado nos meios α -MEMB e α -MEMO e não houve diferenças na porcentagem de embriões produzidos calculados com base no número de oócitos. Estes experimentos foram realizados com ovários provenientes de abatedouros. *In vivo* foram coletados 600 oócitos de doadoras mestiças girolandas, maturados no meio controle TCM-199, sendo os embriões transferidos para as fêmeas receptoras aneladas, previamente escolhidas, e preparadas por protocolo hormonal para a sincronização do cio e avaliadas com ultrassom para receber o embrião de FIV. Os demais embriões formados nos meios testes foram congelados para estudos futuros de expressão de gens de competência e viabilidade e epigenética. Após a TE as fêmeas receptoras foram monitoradas e avaliadas 30 e 90 dias após PIVE para verificar a taxa de gestação; sendo confirmada a prenhez, as fêmeas receptoras foram separadas para acompanhamento da gestação até o momento do parto. As taxas de prenhez foram de 40%, as de nascimentos 25% e de neonatos saudáveis

20%, valores iguais ou maiores dos relatados na literatura. De maneira importante, a metodologia apresentada neste trabalho é a parte prática realizada *in vivo*, que envolve a captação de oócitos por aspiração folicular, a preparação da receptora, a transferência dos embriões de PIVE, a avaliação da prenhez e do neonato; representam uma alternativa viável para serem utilizadas em experimentos futuros e para a aplicação comercial.

Palavras-chave: embriões bovinos; oócitos; fertilização *in vitro*; transferência de embriões; PIVE.

ABSTRACT

The technique of production *in vitro* embryos (PIVE) refers to a series of procedures *in vitro* maturation (IVM), fertilization (IVF) and zygote culture (MIC) needed to produce embryos from Immature oocytes. To assess the viability and competence of the embryo is evident that this transfer to recipient female (TE) and the analysis of the neonate is what will define the actual process effectiveness PIVE. Our goal is the assembly and standardization of techniques and PIVE TE, and validation techniques *in vitro* by the production of embryos from oocytes by ovum and matured in TCM-199; slaughterhouse and oocytes matured in means tests of α -MEM and commercial control. In search of a better culture and a system *in vitro* that was less variable and at the same time, to simulate oocyte maturation observed in animal *in vivo*, developed several systems for IVM culture, in which defined media were formulated, tested and patented some. The means were: MEMC- α , α -MEMB and α -MEM. The first half, more complex, uses oxidizing agents hormones and the second half contains no hormones and the third consists of the diluent. To be compared with the control medium TCM-199, inhibited nuclear maturation, produced a low degree of polyspermy (α -MEMC), produced the same percentage of embryos. FSH pig was used in the media and MEMB α - α -MEM and there were no differences in the percentage of embryos produced calculated based on the number of oocytes. These experiments were performed with ovaries from slaughterhouses. *In vivo* 600 oocytes were collected from crossbred donors Girolanda, matured in control medium TCM-199, and the embryos transferred (ET) for females receiving graded Nelore, previously chosen and prepared by hormonal protocol for synchronization of estrus and evaluated with receiving ultrasound to IVF embryos. The remaining embryos formed in means tests were frozen for future studies of expression of genes of competence and viability and epigenetics. After receiving TE females were monitored and evaluated 30 and 90 days after PIVE to verify pregnancy rate, pregnancy is confirmed, the recipient females were separated for the monitoring of pregnancy until delivery. Pregnancy rates were 40%, the 25% of births and 20% of healthy neonates, equal or higher values reported in the literature. Importantly, the methodology presented in this paper is the practical performed *in vivo*, which involves the collection of oocytes by ovum, the preparation of the recipient, the transfer of

embryos PIVE, assessment of pregnancy and the newborn, represent a viable alternative for use in future experiments and for commercial application.

Keywords: bovine embryos, oocyte maturation, defined media, non defined medium *in vitro* fertilization(IVF), embryo culture(CIV), embryo transfer(TE)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Oócito bovino imaturo logo após a OPU.

Figura 2: A) Preparação da fêmea doadora de oócitos.

B) Preparação dos materiais utilizados.

Figura 3: Preparação para a anestesia.

Figura 4: Preparação para a aspiração folicular (OPU).

Figura 5: Aspiração folicular.

Figura 6: Aspiração folicular.

Figura 7: Folículos ovarianos.

Figura 8: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio controle de laboratório (TCM-199) contendo 10% de soro de vaca em estro e FSH, após 24 horas de cultivo. Nota-se a expansão das células do *cumulus* na maioria dos oócitos, fato indicativo de maturidade oocitária (aumento 10X).

Figura 9: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio α -MEMB suplementado com PVA após 24 horas de cultivo. Nota-se a não expansão das células do *cumulus* em todos os oócitos, fato indicativo de imaturidade oocitária. Os oócitos encontram-se praticamente isolados, ao contrário do observado no meio controle (aumento 10X).

Figura 10: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio α -MEMB suplementado com PVA e 1 ng/ml de FSH após 24 horas de cultivo. Nota-se a expansão das células do *cumulus* em todos os oócitos, fato indicativo de maturidade oocitária. Ao contrário de meio α -MEMB+PVA, os oócitos estão mais agrupados, em função da adição de 1ng/ml de FSH (aumento 10X).

Figura 11: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio α -MEMB suplementado com PVA e 10 ng/ml de FSH após 24 horas de cultivo. Nota-se a expansão das células do *cumulus* em todos os oócitos, fato indicativo de maturidade oocitária. Ao contrário de meio α -MEMB+PVA e α -MEMB+PVA+1FSH, os oócitos estão mais expandidos em função da adição de 10ng/ml de FSH (aumento 10X).

Figura 12: Embriões bovinos produzidos *in vitro*, 48h após a FIV.

Figura 13: Embriões produzidos *in vitro*, sete dias (D7) após a FIV.

A) Maturação em meio controle TCM-199 (aumento 10X).

B) Maturação em meio teste α -MEMB+PVA (aumento 10X).

Figura 14: Embriões produzidos *in vitro*, sete dias (D7) após a FIV.

C) Maturação em meio teste α -MEMB+PVA+1FSH (aumento 10X).

D) Maturação em meio teste α -MEMB+PVA+10FSH (aumento 10X).

Figura 15: Embriões produzidos *in vitro*, sete dias (D7) após a FIV. Maturação em meio teste α -MEMO+10FSH (aumento 10X).

Figura 16: Anestesia para a TE.

Figura 17: Preparação da fêmea receptora para a TE.

Figura 18: Transferência de embriões *in vitro*.

Figura 19: Diagnóstico de gestação através da palpação retal.

Figura 20: Diagnóstico de gestação através do ultrasson.

Figura 21: Bezerros avaliados após o nascimento.

Figura 22: Bezerros avaliados após o nascimento.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Maturação de oócitos *in vitro*, analisada após 3 e 24 horas de cultivo.

Tabela 2 – Fecundação *in vitro* de oócitos maturados em meio de maturação α -MEMC e meio controle TCM-199.

Tabela 3 – Porcentagem de fertilização e desenvolvimento embrionário após maturação de oócitos em meios de maturação TCM-199 e α -MEMC.

Tabela 4 – Dados estatísticos das taxas de produção de embrião *in vitro*, cujos oócitos foram cultivados nos meios-teste de MIV.

Tabela 5 - Taxas de transferências e prenhez obtidas em protocolos de vacas como receptoras de PIVE.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE – benzoato de estradiol

BSA – albumina sérica bovina

CCO(s) – complexo *cumulus* oócito(s)

CE – estradiol cipionato

CG – célula da granulosa

CIV – cultivo *in vitro*

CL – corpo cúteo

D3 – dia 3 de cultivo

D6 – dia 6 de cultivo

D7 – dia 7 de cultivo

eCG – gonadotrofina coriônica equina

EGF – fator de crescimento epidermal

FIV - fertilização *in vitro*

FSH – hormônio folículo estimulante

IA – inseminação artificial

IGF-1 – fator de crescimento semelhante a Insulina - 1

INPI – instituto nacional de propriedade industrial

IVEP - produção *in vitro* de embriões

LH – hormônio luteinizante

MB – meio base

MC – maturação citoplasmática

MEMC – meio completo

MII – metáfase II

MIV - maturação *in vitro*

MN – maturação nuclear

MO – meio origem

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

OMI – fator inibidor da maturação

OPU - aspiração folicular

PGF2 – hormônio prostaglandina

PIVE - produção *in vitro* de embriões

PVA – álcool polivinílico

RPM – rotações por minuto

SFB – soro fetal bovino

TCM-199 – meio de cultura tecidual 199

TE – transferência de embriões

TETF – transferência de embriões em tempo fixo

UnB – Universidade de Brasília

α -MEM – minimum essential medium-alpha

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	17
1.2 A IMPORTÂNCIA DA SINCRONIZAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR (MN) E MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA (MC)	19
1.3 SISTEMAS DE CULTIVO PARA MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	20
1.4 MEIOS DE CULTURA	23
1.4.1 Meio TCM-199	24
1.4.2 Meio α-MEM	25
1.4.2.1 Os meios definidos	25
1.5 SUPLEMENTOS – SORO, PROTEÍNAS E MACROMOLÉCULAS SINTÉTICAS	26
1.6 HORMÔNIOS E FATORES DE CRESCIMENTO	28
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 DOADORA DE OÓCITOS	35
4.2 COLETA DE OÓCITOS	35
4.3 RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA	37
4.4 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS (MIV)	38
4.5 FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	38
4.6 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (CIV)	39
4.7 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (TE)	39
4.8 RECEPTORA	40
4.9 AVALIAÇÃO DA GESTAÇÃO	41

4.10 AVALIAÇÃO DO BEZERRO AO NASCER	42
4.11 CONSIDERAÇÕES GERAIS	42
5 RESULTADOS	44
6 DISCUSSÃO – ANÁLISE CRÍTICA	58
7 CONCLUSÕES	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Estudos mostram que a capacidade para o desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos maturados *in vivo* é superior àqueles maturados *in vitro* (1). Essa hipótese é suportada pelo fato que oócitos coletados para a produção *in vitro* de embriões (PIVE), que provém de folículos dominantes antes do pico de LH, geram uma taxa de 50% de blastocistos, enquanto que oócitos recuperados de folículos entre 2-6 mm de diâmetro geram cerca de 30% (2).

A maturação nuclear normalmente é induzida *in vivo* pelo pico de LH. *In vitro*, no entanto, essa ocorre espontaneamente quando os oócitos são removidos do folículo e cultivados em meio de maturação (3). Isso ocorre porque quando o complexo *cumulus oophorus* (CCO) é removido do ambiente folicular, ele perde o contato com as células da granulosa do folículo com as quais estabelecia uma rede de comunicação por meio de junções *Gap* (4). O rompimento desta barreira químico-física promove a condensação da cromatina e quebra da membrana nuclear (vesícula germinativa) fazendo com que a maturação nuclear (meiose) que estava bloqueada em prófase I, progrida até metáfase II (5).

Existem evidências crescentes que mostram que a qualidade e competência dos oócitos dependem de eventos que ocorrem antes da retomada da meiose (6). Isso porque, para o oócito se tornar competente, não basta que ele sofra a maturação nuclear, ele também deve passar pelo processo de maturação citoplasmática, nas quais mudanças como rearranjo de organelas (7) e síntese de proteínas e mRNA (8) são cruciais para a fertilização e posterior desenvolvimento embrionário.

Portanto, uma das principais causas do baixo desempenho de oócitos maturados *in vitro* é o fato de estes serem retirados de folículos imaturos e, por isso,

ainda não ter passado pelo processo de aquisição de competência que ocorre no final do desenvolvimento folicular, logo após o pico de LH (9).

Torna-se necessário, então, o melhoramento da técnica de maturação *in vitro* (MIV) para permitir ao oócito se desenvolver *in vitro* de forma mimética à situação *in vivo*. Por essa razão, têm sido pesquisados sistemas de cultura que retardam a maturação nuclear. Com isso, um tempo adicional é obtido para que as modificações citoplasmáticas e moleculares aconteçam e assim seja alcançada a sincronia do processo maturacional oocitário como um todo e a competência alcançada.

Estudos propõem que duas etapas sejam realizadas antes da fertilização *in vitro*: uma etapa de pré-maturação, onde o oócito tem a meiose bloqueada, seguida da etapa de maturação *in vitro* propriamente dita (10). Em estudo recentemente, foi desenvolvido por nosso grupo um sistema de cultivo de oócitos, em duas etapas, onde a meiose foi inibida e a maturação citoplasmática foi avançada, promovendo então uma melhor sincronização da maturação como um todo (11).

Em recente revisão de 2012, Viana e colaboradores (12) fazem uma abordagem temporal do desenvolvimento e aplicação da técnica de transferência de embriões após produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos produzidos pela captação de oócitos. A técnica de PIVE refere-se a uma série de procedimentos realizados no laboratório, incluindo maturação (MIV), fertilização (FIV) e cultura dos zigotos (CIV) necessários para produzir embriões a partir de oócitos imaturos. Desde 1990, quando esta técnica era realizada para fins de pesquisa, até o momento atual, no qual ela é a técnica de escolha e tem grande impacto comercial, mudou os conceitos sobre bovinocultura de carne e, mais recentemente de leite. Isso transformou o Brasil no primeiro produtor de embriões comerciais do mundo, se desenvolvendo e aperfeiçoando a cada dia as características genéticas dos rebanhos nacionais de gado de corte (nelore) e leite (girolando).

Este procedimento envolve uma fêmea doadora de boa qualidade genética da qual se captam os oócitos *in vivo* por meio de técnica de ultrassonografia (OPU), a escolha de sêmen de touros de alta qualidade genética e fêmeas receptoras preparadas para receberem os embriões após MIV, FIV e CIV. Apesar de termos evoluído enormemente, tanto na técnica como na aceitação da mesma pelos produtores nacionais, ainda existem problemas a serem resolvidos, e um deles é

exatamente o foco de nosso trabalho que é a PIVE. Pelo fato de coletarmos uma população heterogênea de oócitos e pela rápida maturação nuclear do oócito após a retirada do folículo, muitas etapas que são realizadas *in vivo* são abolidas o que resulta em oócitos com baixa competência em gerar embriões viáveis.

O objetivo principal deste trabalho é a montagem do método de produção *in vitro* e transferência de embriões bovinos, a partir de oócitos captados *in vivo* através da aspiração folicular (OPU) e maturados em meio comercial e meios patenteados. Como são vários assuntos, a metodologia de cada uma das técnicas é apresentada juntamente com o resultado e discussão, seguida de análise crítica atual dos custos e benefícios da utilização das receptoras e dos procedimentos de PIVE e seu futuro na pecuária nacional. Todos os experimentos *in vitro* para avaliar a efetividade dos meios de cultura em produzir embriões foram realizados com oócitos coletados de ovários obtidos em matadouros. Portanto, o objetivo deste trabalho foi validar *in vivo*, por meio da transferência de embriões, o sistema de produção de embriões *in vitro* desenvolvido por nosso grupo.

1.2 A IMPORTÂNCIA DA SINCRONIZAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR (MN) E MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA (MC)

A maturação oocitária é uma etapa crítica no processo da PIVE e vem recebendo crescente atenção pelos pesquisadores. Nessa área, um dos desafios da pesquisa é mimetizar *in vitro* as condições morfofuncionais, bioquímicas e endócrinas do ambiente intrafolicular *in vivo* (13). A maturação oocitária envolve maturação nuclear (MN) e maturação citoplasmática (MC). A MN corresponde ao fim da meiose e a MC é o acúmulo de moléculas de RNAs e proteínas que sustentarão o embrião até a ativação do genoma embrionário. A sincronia entre as duas assegura a competência do embrião e essa é exatamente uma das limitações da produção *in vitro* de embriões, uma vez que *in vitro* a progressão da meiose é

decorrente da remoção do complexo *cumulus oócito (CCO)* do folículo e ocorre em 22 a 24 horas. *In vivo*, folículos de 3 a 4 mm de diâmetro, normalmente utilizados na PIVE, levariam a uma taxa média de crescimento de 1,0 a 1,5 mm/dia, em torno de 96 horas para atingir o tamanho pré-ovulatório (14). Enquanto a qualidade intrínseca do oócito, que é adquirida antes da MN, garante-lhe a competência para gerar embriões, o oócito e os sistemas de cultura *in vitro* de embriões determinam a qualidade dos blastocistos gerados. Relatos de estudos *in vivo* indicam que enquanto a meiose está bloqueada, ocorre à progressão da MC. Sendo assim, durante a maturação *in vitro*, a retirada do oócito do folículo faz com que a meiose seja retomada precocemente, antes que a MC tenha sido completada. É por esta razão que se buscam sistemas de cultura que retardam a maturação nuclear.

1.3 SISTEMAS DE CULTIVO PARA A MATURAÇÃO *IN VITRO*

A origem desta pesquisa encontra-se na utilização pelo nosso grupo de um meio de cultura que mimetiza a fisiologia do folículo ovariano pré-ovulatório, uma vez que a cultura de células da granulosa é capaz de manter a produção de 17β estradiol (E_2) (15) estimula a expressão do RNAm de enzimas esteroidogênicas chave como aromatase e em hemisseções de parede do folículo (16).

Como a simples retirada do complexo *cumulus oophorus* do folículo leva à diminuição do E_2 e aumento da progesterona (P_4) a maturação *in vitro* do oócito acontece, sob altas concentrações de P_4 e baixas de E_2 , o que representa o folículo em sua fase luteínica, pós-maturação do oócito e pós-ovulatório.

Este meio complexo alfa-MEMC (α -MEMC) é constituído pelo diluente α -MEM e por hormônios (androstenediona, insulina), fator de crescimento (IGF-1), substâncias antioxidantes (selênio e transferrina, aminoácidos além da macromolécula inerte polivinilpirrolidona, que substitui o soro fetal bovino-SFB).

Esse último, largamente usado no meio comercial ou de escolha para laboratórios de pesquisa, também induz a luteinização de célula da granulosa.

Por essas razões utilizamos o α -MEMC na MIV de oócitos bovinos e observamos retardo na maturação nuclear alterações nas fertilizações como menor taxa de clivagens anômalas e produção de embriões semelhantes e estes resultados foram comparados ao meio de maturação padrão (comercial).

Em análises das imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras cultivadas em α -MEMC, foi observado que, ao mesmo tempo em que a maturação nuclear permanecia bloqueada a citoplasmática avançava (17).

O objetivo posterior de nosso trabalho foi então analisar quais os componentes do meio inibiam a maturação nuclear e quais alteravam a produção de embriões.

Formulamos o α -MEMB, que não contém hormônios e nem fatores de crescimento. A maturação dos oócitos em meio α -MEMB, mantinha a inibição da maturação nuclear (MN) e não expansão de células do *cumulus* e levava à produção *in vitro* de quantidades idênticas de embriões (17; 19).

Neste mesmo trabalho (17; 19), observou-se que a adição de FSH promovia a expansão das células do *cumulus*, bloqueada pelo α -MEMB. Neste momento, estávamos realizando trabalhos com o α -MEMO, ou seja, um meio mais simples, onde não há adição de hormônios, fatores de crescimento e antioxidantes, e resultados preliminares nos indicam ainda uma inibição na MN e produção de embriões semelhante ao meio comercial.

Tanto o α -MEMB ou MEIO BASE (MB) como o α -MEMO ou MEIO ORIGEM (MO) do nosso laboratório, em resultados recentes tem demonstrado retardar reversivelmente a MN (17; 18). Com isso esta sendo obtido um tempo adicional para que as modificações citoplasmáticas e moleculares aconteçam e assim seja alcançada a desejada sincronia do processo maturacional oocitário como um todo e a competência para o desenvolvimento do embrião seja atingida.

Recentemente, obtivemos em nosso laboratório resultados de capital importância, uma vez que desenvolvemos um sistema de pré-maturação em meio

definido, que é capaz de bloquear a retomada da meiose dos complexos *cumulus oóцитos* (CCOs), na ausência de inibidores sintéticos (17). Tal bloqueio é completamente reversível e o cultivo de oócitos neste meio definido promove uma aceleração da maturação citoplasmática (18) utilizando o meio denominado α -MEMC ou MEIO COMPLETO (MEMC) (19; 20). Além disso, esse sistema mantém as células do *cumulus oophorus* dos CCOs com alto potencial de síntese de hormônios esteróides como observado em um folículo dominante *in vivo* (21). Portanto, mimetizando fisiologicamente o folículo em crescimento.

Este sistema de cultivo, incluindo a formulação do meio de cultura, são objetos de uma patente depositada pelo nosso laboratório da Universidade de Brasília (UnB) junto ao INPI sob o número 012080000612 (ROSA E SILVA, A. A. M.; OLIVEIRA E SILVA, I.; VASCONCELOS, R. B.; GULART, L. V. M.; SILVA, L.G.R.E). Recentemente, Gulart (19) mostrou que outro meio mais simples, o MB, ou meio base e o MO ou meio origem (um meio mais simples ainda), produzem o mesmo número de embriões. Portanto, estamos diante de uma nova patente por envolver a produção *in vitro* de embriões na mesma quantidade dos obtidos com formulações convencionais, porém com qualidade e reprodutibilidade melhoradas. Esses sistemas apresentam interesse para diferentes segmentos industriais, como a agroindústria; quando os sujeitos são mamíferos de grande porte de interesse comercial, além de apresentar interesse quando se refere à aplicação em processos de produção de animais em risco de extinção.

A taxa de produção de blastocisto é um índice pelo qual se podem avaliar os sistemas de cultivo. Existe uma onda de opiniões crescente que indicam que não só a taxa de produção de blastocisto é importante, mas também a avaliação da metodologia a transferência de embriões é mandatória.

Visando a manter os nossos resultados o mais próximo possível da realidade, estamos desenvolvendo a técnica de transferência de embrião (TE) produzidos *in vitro* a partir de oócitos coletados de folículos ovários *in vivo* por sondas guiadas por ultrassom (OPU), maturados em nossos meios definidos (MIV), fertilizados (FIV) e embriões obtidos pelo cultivo (CIV), transferidos para receptoras preparadas.

Neste trabalho, apresentaremos em detalhe toda metodologia montada e padronizada em nosso Laboratório de Biotecnologia da Reprodução do CFS – IB –

UnB (procedimentos *in vitro*) e os procedimentos *in vivo* realizados a campo. Quanto às técnicas de laboratório apresentaremos a MIV, FIV e CIV, após maturação dos oócitos em meios comerciais e meios patenteados pelo nosso laboratório. Quanto às técnicas realizadas a campo, descreveremos preparação da doadora, a coleta dos oócitos (OPU), a preparação das receptoras e transferência dos embriões, os métodos de avaliação das gestações e o neonato o que configura toda a técnica de PIVE.

1.4 MEIOS DE CULTURA

Quais são os melhores substratos e os melhores suplementos do meio de cultura para maturação “in vitro” de oócitos que gere embriões competentes para o desenvolvimento?

Os mecanismos endócrinos do desenvolvimento folicular já estão bem estabelecidos, no entanto, as ações que envolvem a regulação intraovariana necessitam ainda de muito estudo. Este tipo de investigação é feito, principalmente, com cultivos *in vitro* de células foliculares, devido ao alto custo dos estudos *in vivo* e também por causa de limitações metodológicas. Por esse motivo, as descobertas nessa área somente devem ser consideradas relevantes se as características morfológicas, bioquímicas e moleculares das células cultivadas forem mantidas durante a cultura (22).

O potencial comercial da PIVE em bovinos, assim como em outros animais, é afetado por vários fatores, o que inclui sistema de cultura, a qualidade do oócito e a composição do meio de cultura.

Ainda que todas as etapas do processo de produção de embriões *in vitro* (maturação e fertilização do oócito e cultivo do embrião) sejam importantes, sem dúvida, o estabelecimento de um meio de maturação eficiente que promova

adequadas maturações citoplasmática e nuclear é ponto crucial e, certamente, interferirá nas demais etapas, incrementando a proporção de oócitos clivados e, conseqüentemente, de embriões produzidos *in vitro*. A maturação oocitária é a primeira barreira a ser superada: o meio que promova o ambiente mais próximo àquele encontrado no fluido folicular contribuirá não somente para formação de blastocistos, mas embriões de qualidade que produzam altas taxas de prenhezes.

1.4.1 Meio TCM-199

Atualmente o meio TCM-199 é considerado o meio padrão para a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos e é utilizado na maioria dos protocolos de MIV, modificado conforme a rotina do laboratório (22).

Quando suplementado com hormônios ou fatores de crescimento, melhora a maturação citoplasmática. Além disso, o TCM-199 apresenta efeito na maturação oocitária que estimula a divisão celular e, conseqüentemente, o melhor desenvolvimento embrionário (23). Porém, é um meio complexo pela presença, na maioria das vezes, de soros, sendo assim não é possível relacionar cada componente com sua função (23).

O TCM-199 tem sido utilizado para MIV em sistema livre de soro, no qual se obtém embriões bovinos até o estágio de blastocisto (24).

1.4.2 Meio alfa-MEM

O meio alfa-MEM é a incorporação de aminoácidos não essenciais, piruvato de sódio, ácido lipóico, ácido ascórbico, biotina e vitamina B12 ao meio MEM. Foi testado pela primeira vez para a MIV e comparado a outros sete meios de culturas diferentes, utilizando o TCM-199 como controle. Em quatro desses meios, nos quais o alfa-MEM foi utilizado como diluente, os resultados foram semelhantes ao controle (23).

O alfa-MEM já foi utilizado para iniciação do crescimento de folículos ovarianos humanos durante os primeiros dez dias de cultura, além do aumento no índice de embriões produzidos e taxas de gestação de camundongos nos quais a taxa de formação e eclosão de blastocistos e o número de células dos blastocistos foram maiores (23).

Dois outros estudos mostram a função estimuladora do meio alfa-MEM no desenvolvimento de embriões murino e humano, com aumento nos índices de gestação e redução nas taxas de aborto espontâneo (24).

1.4.2.1 Os meios definidos

Para que um sistema de cultura de células se torne válido, ele deve se aproximar cada vez mais do evento fisiológico e ser totalmente reprodutível. Essas são as duas premissas mais importantes para aceitar os resultados de um sistema *in vitro*.

Montrezor e colaboradores (25) descreveram pela primeira vez um sistema de cultura de células da granulosa totalmente definido, α -MEM + álcool polivinílico

(PVA), no qual a albumina sérica bovina (BSA) foi substituído por PVA (álcool polivinílico), um doador de macromoléculas inerte. Nesse sistema, a produção de estradiol foi elevada até 48 horas de cultura e se manteve até 144 horas, além da morfologia das células terem sido preservadas. Portanto, foi desenvolvido um sistema estritamente definido que permite o estudo dos fatores fisiológicos que regulam a proliferação e diferenciação celular.

As células da granulosa (CG) cultivadas *in vitro* sob tais condições mostraram atividade funcional de CG da fase folicular do ciclo estral, mantendo a sinalização oócito – CG que inclui a secreção de diferentes fatores, incluindo o OMI (inibidor da maturação oocitária). Conclui-se, então, que o desenvolvimento de um sistema de cultura definido de CG bovinas produtoras de estradiol mimetiza um folículo em desenvolvimento, permitindo a avaliação detalhada do desenvolvimento e esteroidogênese folicular e maturação oocitária (26-27).

Os meios de cultura para maturação de oócitos convencionais e meios de cultura patenteados em laboratório implicam em meios que promovem no COCs, células do *cumulus*, um ambiente altamente estrogenizado, que mimetiza o ambiente intrafolicular *in vivo*, próximo a ovulação e maturação oocitária.

1.5 SUPLEMENTOS - SORO, PROTEÍNAS E MACROMOLÉCULAS SINTÉTICAS

A suplementação protéica é um fator limitante na eficiência dos sistemas de cultura *in vitro*. O soro e a albumina sérica bovina (BSA) são as fontes proteicas mais comumente utilizadas como suplemento em meios de cultura de células foliculares ovarianas (células da teca e granulosa), oócitos e embriões.

O soro fetal bovino promove a proliferação celular, é rico em hormônios, lipídeos, sais minerais, fatores de crescimento, sendo por isto amplamente utilizado.

No entanto, o soro possui fatores cuja natureza e concentrações são desconhecidas, o que afeta a atividade celular. Além do mais, apresenta muita variação entre os lotes utilizados, o que dificulta a padronização de protocolos experimentais (28; 29 30). Os meios de cultura que contém soro são então considerados meios indefinidos.

Estudos que utilizam a adição de soro ao cultivo de células da granulosa de ovelha (22; 31) e de vaca (29), relatam que essas sofrem luteinização espontânea, resultando numa rápida queda da concentração de estradiol e aumento da secreção de progesterona na cultura (22; 29; 30).

Gutiérrez e colaboradores (32) descreveram pela primeira vez um sistema de cultura para células da granulosa bovinas, no qual o soro foi substituído por BSA, onde a secreção de estradiol foi induzida e mantida por 6 dias em resposta a concentrações fisiológicas de FSH, IGF-I e insulina, o que proporcionou a diferenciação celular semelhante à situação *in vivo*. No entanto, encontraram contaminação de progesterona no BSA, sendo este modelo considerado então um sistema semi-definido (25).

O álcool polivinílico (PVA) e a polivinilpirrolidona (PVP) são polímeros sintéticos, hidrofílicos, com peso molecular entre 30.000 a 70.000, utilizados em meios de cultura para a estabilização da pressão osmótica, como surfactantes e agentes quelantes de metais pesados (29).

A substituição de BSA por essas macromoléculas sintéticas no cultivo de células foliculares e maturação de oócitos foi realizada por nosso grupo, onde excelentes resultados foram obtidos. Tais resultados, como a manutenção da morfofisiologia e capacidade esteroideogênica das células foliculares como observado *in vivo* (25; 33), maturação *in vitro* de oócitos bovinos com melhor sincronização da maturação nuclear e citoplasmática (17; 27) e produção de embriões a partir de oócitos maturados nesse sistema na mesma taxa que o grupo controle (20) mostram todo o potencial desse sistema de cultura totalmente definido.

1.6 HORMÔNIOS E FATORES DE CRESCIMENTO

Para formular um meio sem a suplementação de soro, determinados fatores são requeridos para a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário.

A suplementação hormonal mais utilizada são as gonadotrofinas – hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). Essas, juntamente com os esteróides e com os fatores de crescimento, são rotineiramente utilizadas apesar de esse emprego ser controverso, fato que gera grande variação entre os protocolos experimentais (24).

Preparações altamente purificadas de LH e o FSH utilizadas nas primeiras horas de MIV (34) têm mostrado efeitos positivos na maturação oocitária. Na ausência de FSH, a insulina adicionada ao meio α -MEMB em baixa concentração diminui a produção de blastocistos e em altas concentrações acelera o tempo de ação de produção de embrião, obtendo-se blastocistos a partir do 3º dia de CIV, porém eles não alcançam a fase de blastocistos. Esses resultados podem indicar que este processo de MIV em α -MEMB cursa juntamente com situações patológicas de hipo e hiperinsulinemia, ou seja, diabetes e obesidade (resultados preliminares do laboratório).

Dos esteróides o mais importante na MIV é o 17- β estradiol, que atua estimulando a maturação oocitária em baixas concentrações, enquanto que seu efeito é adverso em altas concentrações (35).

A progesterona também é utilizada como suplemento de MIV, é justificável se considerarmos que a secreção de progestágenos aumenta tardiamente no período pré-ovulatório. Em primatas humanos e não humanos a concentração de progesterona no fluido folicular está correlacionada com a maturidade e qualidade de oócitos (32).

A insulina é geralmente adicionada em altas concentrações às culturas de folículos ovarianos. No entanto, apesar de seu alto benefício à sobrevivência das células somáticas ovarianas, quando em alta concentração, pode apresentar efeitos

prejudiciais à qualidade do oócito (22; 36). Estudos tem mostrado que a suplementação com insulina, transferrina e selênio na MIV melhoram a maturação citoplasmática e a competência embrionária (37).

Em nosso laboratório, a insulina adicionada ao α -MEMB com FSH, aumenta a produção de embriões e altera a expressão de genes relacionados à competência embrionária (38).

Fatores de crescimento, como EGF (fator de crescimento epidermal) e IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) afetam a maturação e competência oocitária. O EGF durante a MIV estimula a expansão das células do *cumulus* e significativamente aumenta a taxa de maturação nuclear de oócitos, o que aumenta a taxa de clivagem embrionária e de embriões que alcançam o estágio de 5 a 8 células 72 horas após a fertilização (39).

O IGF-I possui papel na função ovariana, ovulação, maturação citoplasmática e produção de esteróides (34), além de atuar como agente anti-apoptótico durante a maturação de oócitos (40). Wasielak e Bogacki (40) sugeriram que a quantidade de IGF-I produzido pelas células do *cumulus* durante o cultivo *in vitro* é insuficiente para a maturação, sendo a suplementação necessária.

2 JUSTIFICATIVA

O grande desafio da pesquisa, particularmente na produção animal, é produzir inovação, além de apenas gerar conhecimento. A recente e expressiva expansão do uso das técnicas de produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil é um exemplo importante de inovação. Acrescenta-se aqui, a grande expansão que houve no Brasil no setor de infertilidade humana desenvolvida graças ao esforço conjunto da ciência básica e aplicada. As biotécnicas geradas em decorrência de grande esforço de pesquisa ocorrido particularmente na última década foram rapidamente aceitas e incorporadas pelo setor produtivo. Hoje, a chamada “produção *in vitro* de embriões”, ou PIVE, responde por 70% do total de transferências de embriões bovinos realizadas no país, e permitiu ao Brasil atingir a cifra de mais de 250.000 embriões transferidos em 2006 (41).

A expansão da atividade resultou no aumento na participação relativa do país no total de transferências realizadas no mundo, respondendo por aproximadamente 25% do total global, o que o tornou referência nesta área (42). Apesar do significativo avanço ocorrido na PIVE no Brasil, diversas aplicações potenciais da técnica não vêm sendo efetivamente exploradas. Esta limitação é decorrente da baixa eficiência relativa da PIVE, considerando-se as taxas médias de embriões (20 a 50%) e gestações (30 a 40%) obtidas.

Diversos trabalhos são realizados visando otimizar os sistemas de maturação, fertilização e cultivo embrionário (17; 43), tendo como objetivos finais aumentar não apenas o número, mas, também, o potencial de desenvolvimento e a criotolerância dos embriões. Contudo, conforme definido por Sirard e colaboradores (44), “*As condições do cultivo in vitro apenas possibilitam ao oócito a expressão de seu potencial de desenvolvimento, de forma que a PIVE de embriões bovinos é limitada, mesmo em condições ideais de cultivo, pelas características iniciais dos oócitos cultivados*”. A maturação oocitária é a etapa crítica no processo da PIVE, assim como na produção de citoplastos destinados a transferência nuclear (clonagem), e vem recebendo crescente atenção pelos pesquisadores. Nesse contexto, um dos

desafios da pesquisa é mimetizar em cultivo as condições originais do desenvolvimento oocitário no ambiente intrafolicular, quer seja em relação à reprodução do ambiente folicular original quanto a dinâmica temporal dos eventos (13). A progressão espontânea da meiose decorrente da remoção do complexo *cumulus* (células da granulosa) – oócito (CCO) do folículo é uma das limitações para o controle da sincronia entre a maturação citoplasmática e nuclear, uma vez que em condições de cultivo o processo de maturação é completado em 22 a 24 horas, de forma muito diferente do que acontece naturalmente no ovário. A maturação nuclear corresponde ao fim da meiose e a citoplasmática é o acúmulo de RNAs e proteínas que sustentarão o embrião até a ativação do genoma embrionário. Os folículos de três a quatro mm de diâmetro, normalmente utilizados na PIVE, levariam, a uma taxa média de crescimento de 1,0 a 1,5 mm/dia, em torno de quatro dias para atingir o tamanho pré-ovulatório (14). Enquanto a qualidade intrínseca do oócito, que é adquirida antes da maturação nuclear, garante-lhe a competência para gerar embriões, o oócito e os sistemas de cultura *in vitro* de embriões determinam a qualidade dos blastocistos gerados.

Relatos de estudos *in vivo* indicam que enquanto a meiose está bloqueada, pode ocorrer a progressão da maturação citoplasmática. No entanto, durante a maturação *in vitro*, a retirada do oócito do folículo faz com que a meiose seja retomada precocemente, antes que a maturação citoplasmática tenha sido completada. É por essa razão que se buscam sistemas de cultura que retardam a maturação nuclear. Com isto, será obtido tempo adicional para que as modificações citoplasmáticas e moleculares aconteçam e assim seja alcançada maior sincronia do processo maturacional oocitário como um todo e a competência para o desenvolvimento seja atingida.

Recentemente obtivemos em nosso laboratório resultados de capital importância, uma vez que desenvolvemos um sistema de pré-maturação em meio definido, que é capaz de bloquear a retomada da meiose dos complexos *cumulus* oócitos (CCOs), na ausência de inibidores sintéticos (17; 19). Tal bloqueio é completamente reversível e o cultivo de oócitos neste meio definido promove uma aceleração da maturação citoplasmática. Além disso, este sistema mantém, as células do *cumulus oophorus* dos CCOs com alto potencial de síntese de hormônios esteróides estrogênio, como observado em um folículo dominante *in vivo*. Portanto,

mimetizando fisiologicamente o folículo em crescimento, este sistema de cultivo, incluindo a formulação do meio de cultura são objetos de uma patente depositada pelo nosso laboratório da UnB junto ao INPI (17; 21).

3 OBJETIVOS

- Montagem do método de captação de oócitos pela técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU);
- Montagem do método e da técnica de transferência de embriões bovinos produzidos *in vitro*;
- Padronização das técnicas de aspiração folicular, produção *in vitro* de embriões bovinos e a transferência de embriões;
- Validação das técnicas *in vitro* pela produção de embriões provenientes de oócitos captados pela técnica de aspiração folicular (OPU) e maturados em meio controle TCM-199;
- Validação das técnicas *in vitro* pela produção de embriões provenientes de oócitos de ovários de matadouros maturados em meio controle TCM-199 e em grupos de meios definidos α -MEM.

4 MATERIAL E MÉTODOS

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

O primeiro bezerro nascido de FIV, a partir de um oócito, cuja maturação foi realizada *in vitro*, ocorreu em 1981 (45). A fêmea bovina tem em seus ovários ao nascimento em torno de 150.000 folículos primordiais. Ao chegar à puberdade, esse número diminui para 12.000 a 86.000, e desses somente poucos chegam à ovulação durante a vida desta fêmea, enquanto o restante sofre atresia (22). A técnica de punção folicular guiado por ultrassom permite maximizar o aproveitamento desses óvulos que fisiologicamente são produzidos nos ovários de uma fêmea, levando-os ao sistema de produção *in vitro* de embriões (45).

Além do aumento e da maior velocidade de produção de bezerros, e conseqüentemente no ganho genético em carne ou leite, a produção de embriões *in vitro*, a partir de material de vacas vivas, traz outros benefícios à pesquisa e à produção, tais como (46):

- Formação de banco de oócitos criopreservados. O oócito congelado permitirá, no futuro, a regeneração de raças em extinção, pela fecundação *in vitro* de tais e transferência dos embriões para fêmeas receptoras;
- Avaliação simultânea de diferentes acasalamentos para melhoramento animal;
- Recuperação de material genético de vacas que apresentam problemas reprodutivos adquiridos;
- Produção de embriões a partir de fêmeas imaturas, diminuindo assim o intervalo entre gerações.

4.1 DOADORA

Utilizando doadoras superovuladas o número médio de ovócitos coletados em vacas superovuladas é de 13 estruturas. Em novilhas cíclicas a média é de 9,5 ovócitos recuperados. A utilização deste protocolo facilita a implantação desta técnica em um laboratório, visto que a recuperação oocitária é maior e a visualização dos folículos para a punção é facilitada, quando comparada com doadoras não superovuladas. Entretanto, a produção final de blastocistos, ao longo de um ano, é significativamente menor.

Utilizando doadoras não superovuladas, o número médio de oócitos coletados em vacas e novilhas possui variação simples ou até dupla (desvio de 4,2 a 8,8 para as médias respectivas). Enfim, o número médio de oócitos recuperados é de seis estruturas por sessão de punção, podendo esta ser repetida a cada três dias, sem causar danos maiores ao ovário. Embora este protocolo necessite de dedicação maior (número de sessões), o número de produtos nascidos de uma doadora ao ano é também, significativamente, maior.

Em nossos testes, utilizou-se fêmeas dóceis doadoras não superovuladas, sem necessidade de anestésicos gerais. O número de oócitos coletados variou entre 2 e 10 oócitos, coletados a cada 15 dias.

4.2 COLETA DE OÓCITOS

Preparação dos animais (figura 1)

O animal pode ser sedado com acepromasinal na dose de 1,5 mL intravenoso (I. V.) quando muito nervoso. A sedação apenas facilita a contenção, sendo desnecessária em animais mansos. Após o animal estar devidamente contido no brete, é efetuada anestesia epidural baixa aplicando-se 5mL de cloridrato de lidocaína a 2% por via I.V.

Montagem dos equipamentos e punção dos folículos (figuras 1, 2, 3, 4 e 5)

A probe é montada conforme indicação do fabricante e a agulha inserida no mandril, tomando todos os cuidados de assepsia. A extremidade livre do tubo é acoplada na bomba de vácuo e regulado a 70 mmHg. Primeiramente a probe é introduzida na vagina. Através da palpação retal, o ovário é posicionado contra a extremidade da probe de forma que os folículos a serem aspirados estejam no percurso da linha de punção indicada na tela do ultrassom. Uma vez que a agulha esteja próxima do folículo a ser aspirado, o pedal de acionamento do vácuo é pressionado e o folículo aspirado. O material recolhido da aspiração recuperado em tubos cônicos estéreis de 50 mL de capacidade, protegidos da luz e mantidos à temperatura de 30° C, contendo 3 mL de meio de aspiração.

Os materiais necessários para a OPU são:

- Aparelho de Ultrassom;
- Sonda transvaginal de 5 ou 7,5 MHz;
- Bomba à vácuo;
- Sistema de agulhas (18 G e 58 mm) e cânulas;
- Tubo de coleta;
- . Aquecedor de tubos;
- . Anestésico.
- . DMPBS
- . Antibiótico
- . Soro fetal
- . Heparina

4.3 RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA

Após a aspiração, os oócitos são levados para o laboratório, onde são filtrados em filtro para embriões e lavados três vezes com meio de aspiração. Em seguida são lavados uma vez em meio de transporte e selecionados sob estereoscópio (lupa), observando-se como critérios a quantidade das células do *cumulus* e as características dos oócitos e classificados. Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram morfológicamente classificados quanto à qualidade como de grau I, II e III (excelente, bom e regular respectivamente). Rejeitam-se aqueles que apresentam características de degeneração. Após seleção, os oócitos bons são colocados em criotubos de 1mL contendo meio de transporte para serem levados até o laboratório de FIV a uma temperatura média de 36°C. O transporte até o laboratório realizou-se durante um tempo não superior a 2 horas após o término da OPU.

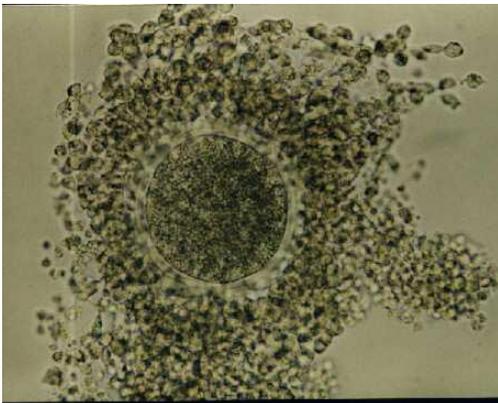


Figura 1: Oócito bovino imaturo, logo após a seleção.

Fonte: (45)

4.4 MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS (MIV)

Os oócitos chegam ao laboratório e são lavados com o respectivo meio de maturação *in vitro*, e após são colocados em placas de petri contendo gotas com meio de maturação previamente preparado e mantidos em incubadora a 38.5°C e 5% de CO₂. Após 24 horas de cultivo, os oócitos são fecundados com o sêmen de touro escolhido.

4.5 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

A fecundação é uma reação em cascata, desencadeada pela ligação do espermatozóide à zona pelúcida, penetração na membrana plasmática e seu alojamento no interior do citoplasma oocitário (38). A fusão do espermatozóide induz a ativação do oócito, representada inicialmente por mudanças do potencial transmembranário e uma mobilização maciça de cálcio (48).

Após a MIV, os oócitos foram transferidos para placa contendo gotas de 90 µL de meio Fert-Talp, acrescido de BSA, piruvato de sódio e de heparina. A escolha do touro é baseada em critérios genéticos, mas igualmente sobre sua habilidade fecundante *in vitro*. O sêmen congelado foi preparado em gradiente Percoll 90% e 45%. A palheta de sêmen de um touro *Bos taurus* testado para a PIVE foi descongelada por 20 segundos em banho-maria a 38°C. O gradiente de Percoll juntamente com o sêmen foram submetidos à centrifugação de 4750 rpm por 30 minutos. A concentração final foi ajustada para 1 x 10⁶ espermatozóides/mL de meio de fertilização. Os oócitos/espermatozoides foram incubados a 38.5°C por 20-22 horas em estufa de cultivo nas mesmas condições da MIV.

4.6 CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (CIV)

As células do *Cumulus oophorus* (CCOs) foram removidas por movimentação de agitação mecânica por pipeta de 10µL. Os presumíveis zigotos foram lavados em gotas de meio SOF. Os zigotos foram cultivados por nove dias sob óleo mineral em estufa 5% de CO₂, à temperatura de 38.5°C. A avaliação da taxa de clivagem (D3) foi efetuada 72 horas após a fecundação (DO). A produção de blastocistos (inicial, blastocisto e blastocisto expandido) foi avaliada ao sétimo dia (D7) e a taxa de eclosão (BE) no oitavo dia (D8) de cultivo.

4.7 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (TE)

A etapa de transferência dos embriões (TE) também é de suma importância. Quanto à receptora, a condição corporal, histórico reprodutivo, habilidade materna, plano nutricional e sanitário são decisivos para concluir com sucesso todo trabalho anteriormente executado (49). Em outras palavras, o sucesso final da PIVE se dá com o nascimento do bezerro que transcorre no estabelecimento da gestação e parto; com o nascimento de um animal saudável.

Atualmente, as taxas de gestação (diagnosticada entre o 45º e 60º dia) de embriões PIVE situam-se em torno de 30-40%. Essas taxas são inferiores às obtidas com outras técnicas reprodutivas como a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões produzidos *in vivo*.

Para verificar a capacidade de estabelecimento de gestação dos embriões produzidos, 30 embriões no estágio de blastocisto (D7) do grupo controle, foram envasados (palhetas de 0,25 mL em meio TCM HEPES + 10% SFB) e transportados até o local onde se encontram as receptoras para transferência pela técnica não cirúrgica. Em cada receptora será transferido apenas um embrião. As receptoras

serão mantidas em pastejo de forrageira nativa sendo suplementadas por sal mineral e água.

4.8 RECEPTORA

No momento em que se programa a realização da PIVE, a primeira etapa a ser realizada é a seleção e avaliação de fêmeas receptoras do embrião. Para posteriormente realizar o protocolo hormonal mimetizando uma gestação, preparando a fêmea para receber o embrião. Esta é uma das principais etapas, e um dos principais pontos de questionamentos na difusão desta tecnologia; pois variações na taxa de gestação das receptoras é um problema frequente. Desta forma seguem alguns critérios principais a serem observados na fêmea receptora (46):

- Sem anomalias no trato genital. Um exame ginecológico deve ser realizado em todas as candidatas à futuras receptoras.
- Boa fertilidade, ciclos regulares. As receptoras devem ser as fêmeas mais férteis do plantel.
- Boa condição corporal. Esta associada a uma nutrição adequada.
- Sanitariamente perfeita. Não é admissível que uma receptora, depois de gestante venha a perder a gestação devido a alguma doença infecto-contagiosa, que poderia ser facilmente diagnosticada durante o processo de seleção.
- Boa estatura. A importância deste fator vem da necessidade de um parto sem complicações. Caso haja mais receptoras que embriões, selecionar as mesmas por grau de sincronia: característica do corpo lúteo: escore corporal e fertilidade anterior.

Protocolo escolhido na utilização de fêmeas bovinas escolhidas como receptoras:

D0	D8	D17
Implante de progesterona + 2mL benzoato de estradiol	Retira o implante + 0,5 mL cipionato de estradiol+2mL Prostaglandina+ 1,5mL gonadotrofina Coriônica equina.	Inovulação

4.9 AVALIAÇÃO DA GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação é realizado no 30º dia, com palpação retal e, posteriormente, via ultrasonografia o monitoramento da gestação aos 60 dias. Em cada exame é realizado a identificação e a mensuração do embrião/feto. Eventuais anormalidades no desenvolvimento fetal e placentação, assim como a ocorrência de interrupção do processo gestacional com reabsorção ou expulsão do feto, são devidamente documentadas.

O período gestacional é calculado pelo intervalo FIV – parto, sem indução. A progressão do parto é monitorada para a avaliação da incidência de distocias, caracterizada pela duração do parto, grau de dificuldade e complicações que possam ocorrer, necessitando ou não de intervenção médico veterinária.

4.10 AVALIAÇÃO DO BEZERRO AO NASCER:

Avalia-se o bezerro após o nascimento, verificando as condições vitais normais como a frequência cardíaca, teste de mamada e seu desenvolvimento ao andar.

4.11 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este trabalho foi executado em uma fazenda experimental na cidade de Montes Claros/MG para a parte *in vivo* realizada a campo e manejo dos animais.

Foram feitas cinco aspirações foliculares (OPU) em dez fêmeas bovinas doadoras da raça girolando, sendo obtido o total de seiscentos óocitos viáveis levados ao laboratório para realização da produção *in vitro* de embriões.

No laboratório, seis meios testes de maturação *in vitro* (α -MEM), desenvolvidos pelo nosso grupo de estudo, foram testados para a produção de embriões; e outro meio de maturação (TCM-199) já usado comercialmente foi usado como meio controle.

Após às 24h de maturação *in vitro*, os oócitos foram fertilizados com sêmen sexado e mantidos em incubadora por aproximadamente 18 -20h. Após este período, os prováveis zigotos foram transferidos para o meio próprio de cultura de embriões bovino. Em 72h de cultura, foi realizada a clivagem (D3-contagem de estruturas com mais de 8 células formadas) e troca da metade do meio de cultura para meio novo.

Após 144h (D6-dia6) já é possível ver alguns embriões formados e feita a contagem de prováveis embriões para a transferência. No dia seguinte (D7- dia 7 pós FIV), foi feita a contagem dos embriões produzidos em cada meio de maturação; e realizado a comparação dos meios testes com o meio controle.

Somente os embriões produzidos no meio controle foram transferidos para as fêmeas receptoras (já preparadas com protocolos de TETF anteriormente). Os embriões produzidos nos meios testes foram congelados para realização de estudos futuros.

5 RESULTADOS



Figura 2: A) Preparação da fêmea doadora de oócitos.

B) Preparação dos materiais a serem utilizados.



Figura 3: Preparação para anestesia.



Figura 4: Preparação para aspiração folicular.



Figura 5: Aspiração folicular



Figura 6: Aspiração folicular

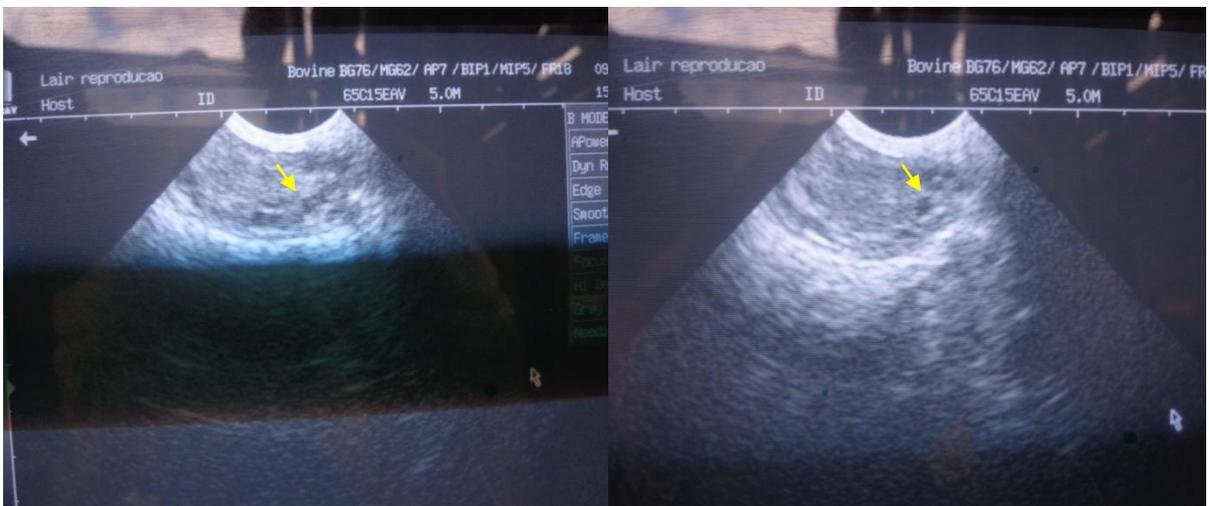


Figura 7: A seta indica os folículos ovarianos a serem aspirados.



Figura 8: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio controle de laboratório (TCM-199) contendo 10% de soro de vaca em estro e FSH, após 24 horas de cultivo. Nota-se a expansão das células do *cumulus* na maioria dos oócitos, fato indicativo de maturidade oocitária (aumento 10X).

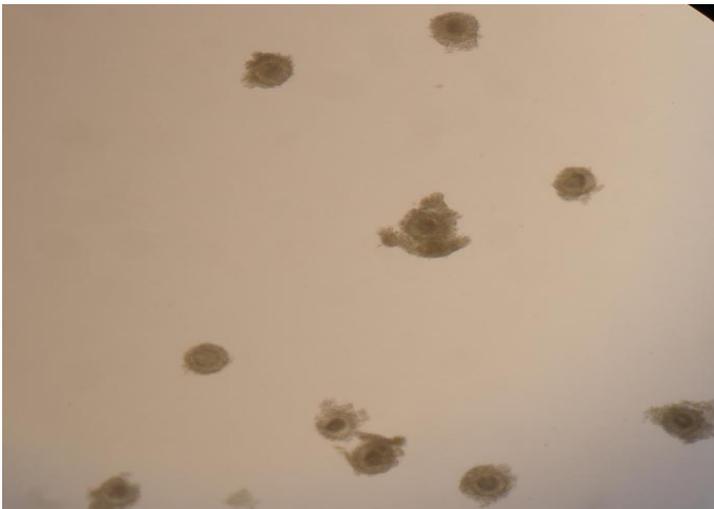


Figura 9: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio α -MEMB após 24 horas de cultivo. Nota-se a não expansão das células do cumulus em todos os oócitos, fato indicativo de imaturidade oocitária. Os oócitos encontram-se praticamente isolados, ao contrário do observado no meio controle (aumento 10X).

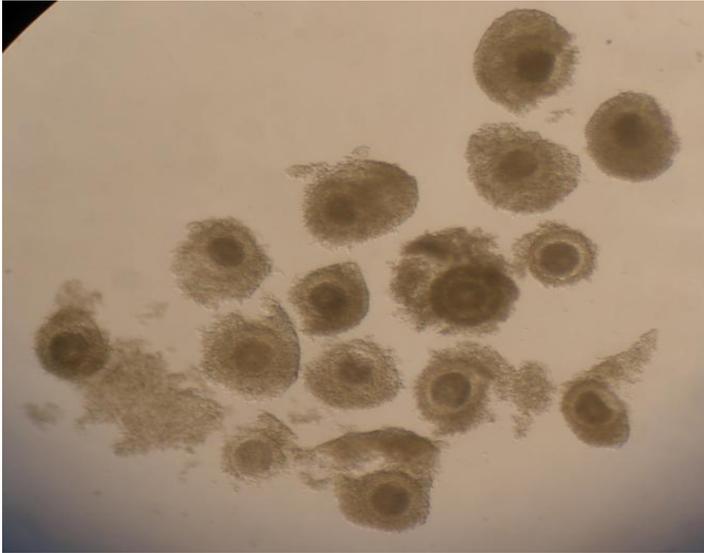


Figura 10: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio α -MEMB com 1 ng/mL de FSH após 24 horas de cultivo. Nota-se a expansão das células do cumulus em todos os oócitos, fato indicativo de maturidade oocitária. Ao contrário de meio α -MEMB, os oócitos estão mais agrupados, em função da adição de 1ng/mL de FSH (aumento 10X).

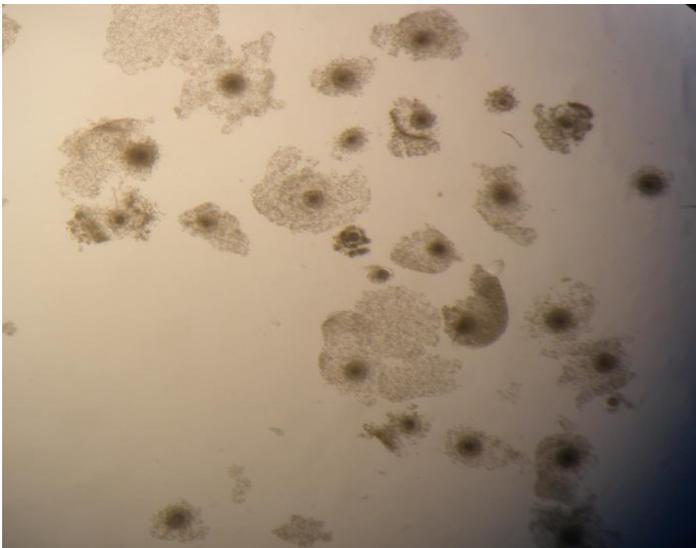


Figura 11: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio α -MEMB com 10 ng/mL de FSH após 24 horas de cultivo. Nota-se a expansão das células do cumulus em todos os oócitos, fato indicativo de maturidade oocitária. Ao contrário de meio α -MEMB e α -MEMB+1FSH, os oócitos estão mais expandidos em função da adição de 10ng/mL de FSH (aumento 10X).

Tabela 1 Maturação de oócitos *in vitro*, analisada após 3 e 24 horas de cultivo, representada como a porcentagem do número total de oócitos maduros analisados

Tempo cultivo	3h	24h
TCM-199	89% ^a (98)	82% ^a (67)
α-MEMC	33% ^b (85)	77% ^a (75)

() = Número de oócitos analisados

TCM-199 = Meio controle/ padrão ou comercial – meio não definido

α-MEMC = Meio definido

Oócitos em MII foram considerados maduros. Oócitos em telofase I, metáfase I ou < MII – foram considerados imaturos

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa $p < 0,05$

Tabela 2 Fecundação *in vitro* de oócitos maturados em α-MEMC e meio controle TCM-199

	Normal	Poliespermia	NF
TCM – 199 (120)	62,8	25,7 ^a	11,4 ^a
α-MEMC (150)	71,4	7,14 ^b	21,4 ^b

Os resultados são apresentados como uma porcentagem dos oócitos analisados.

() número de oócitos analisados.

Na observação de 2 pró-núcleos o oócito foi considerado com fertilização normal. Mais de 2 pró-núcleos considerou-se poliespermia. Não fecundados são os restantes de oócitos (NF).

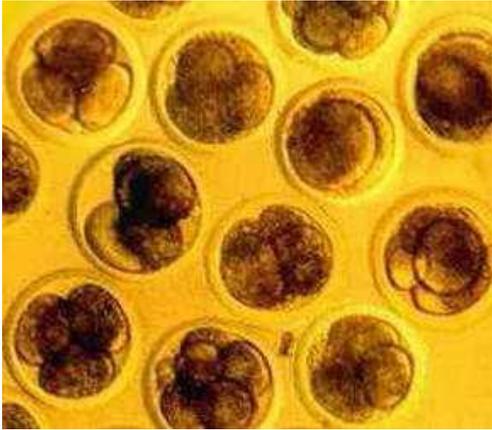


Figura 12: Embriões bovinos produzidos *in vitro*, 48h após a FIV.

Fonte: (45)

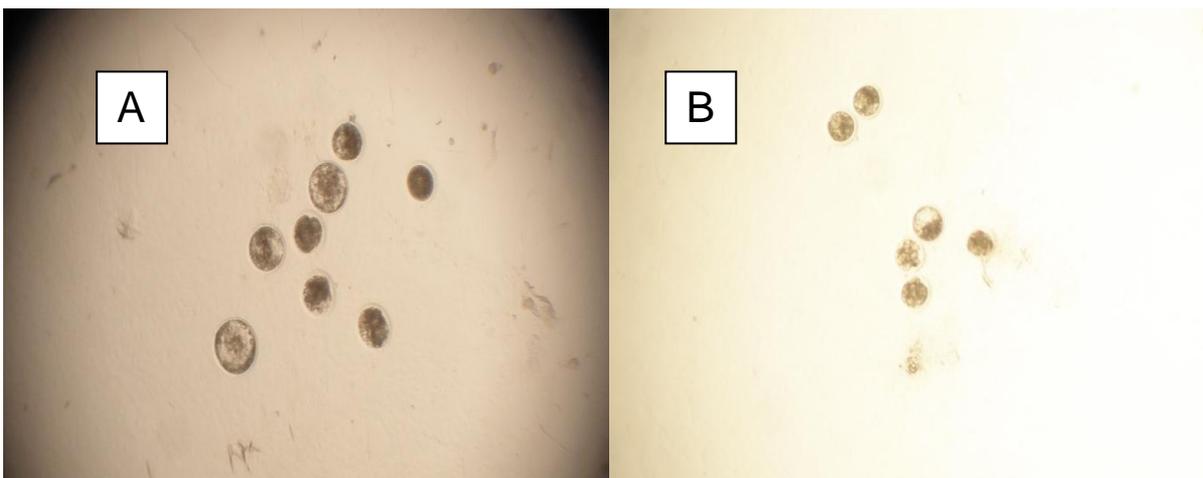


Figura 13: Embriões produzidos *in vitro*, sete dias (D7) após a FIV.

A) Maturação em meio controle TCM-199 (aumento 10X).

B) Maturação em meio teste α-MEMB+PVA (aumento 10X).

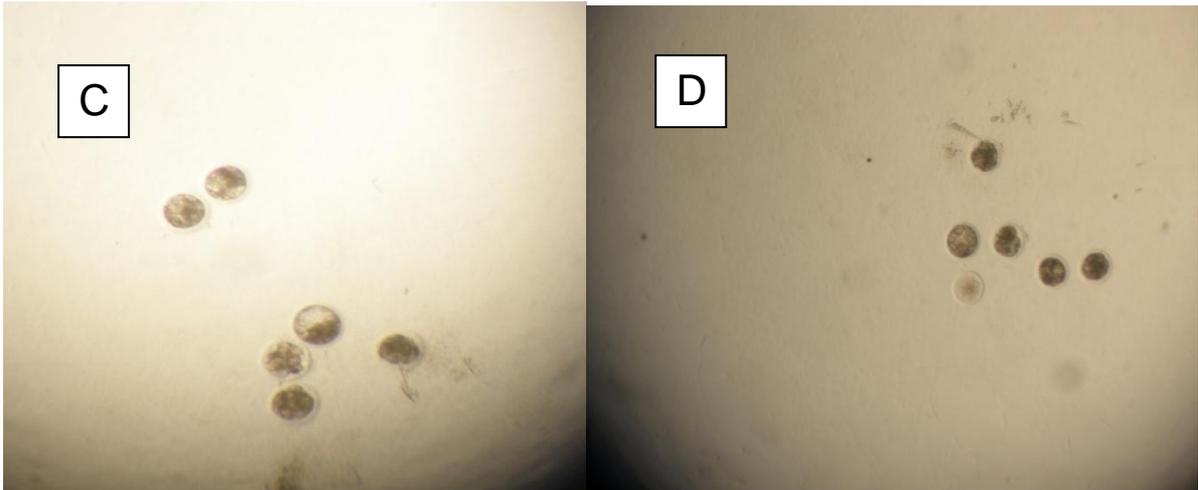


Figura 14: Embriões produzidos *in vitro*, sete dias (D7) após a FIV.

C) Maturação em meio teste α -MEMB+PVA+1FSH (aumento 10X).

D) Maturação em meio teste α -MEMB+PVA+10FSH (aumento 10X).



Figura 15: Embriões produzidos *in vitro*, sete dias (D7) após a FIV. Maturação em meio teste α -MEMO+10FSH (aumento 10X).

Tabela 3 Porcentagem de fertilização e desenvolvimento embrionário após maturação de oócitos em meios de maturação TCM-199 e α -MEMC

Grupos	Tratamento	Replicas	Oócitos	%CL	%8c	%BL	BEX %Ex	%ECL BHat	BL/CL	BL/8c
1	TCM-199	9	238	^a 0,71	^a 0,46	0,323 ^a	0,25 ^a	0,07 ^a	0,46 ^a	0,74 ^a
2	α -MEMC	8	204	^b 0,53	^{bc} 0,27	0,245 ^b	0,19 ^a	0,08 ^a	0,44 ^a	1,29 ^b

% CL = Porcentagem de clivagem

% 8c = Porcentagem de embriões com 8 células

%BL = Porcentagem de blastocistos

%BEXEx = Porcentagem de blastocistos em expansão

% BHATECL = Porcentagem de blastocistos eclodidos

BL/CL = Relação entre blastocistos e clivados

BL/8c = Relação entre blastocistos e 8 células

Tabela 4 Dados estatísticos das taxas de produção de embrião *in vitro*, cujos oócitos foram cultivados nos meios-teste de MIV

MEIOS DE MATURAÇÃO “IN VITRO” (MIV) DE OÓCITOS	% PRODUÇÃO DE EMBRIÕES “IN VITRO”
TCM-199	31,00 ^A
α -MEMB	25,00 ^A
α -MEMB +1ng/mL FSH	24,00 ^A
α -MEMB + 10 ng/mL FSH	25,00 ^A
α -MEMO	23,00 ^A
α -MEMO + 1 ng/mL FSH	18,00 ^A
α -MEMO + 10ng/mL FSH	18,00 ^A

Oócitos selecionados foram cultivados nos meios-teste de MIV e foram avaliados quanto a produção de embrião (dados apresentados em porcentagem).

Teste usado: Qui ao quadrado

Letras iguais representam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos (A).

A expansão das células do *cumulus* é pequena em α -MEMC, α -MEMB e α -MEMO quando comparada ao controle (TCM-199) o que está associada à ausência de gonadotrofinas nos meios definidos. A adição de FSH a estes meios aumenta a expansão destas células porque as gonadotrofinas estão envolvidas na secreção do ácido hialurônico (50). Contudo, a expansão das células do *cumulus* não parece ser essencial para a competência oocitária (20) ou para a habilidade do oócito se desenvolver após fertilização. Reforçando estes dados da literatura em meio α -MEMB ou α -MEMO, a presença de FSH expandiu as células do *cumulus* porém não aumentou a produção de embriões (tabela 4). Neste estudo, a ausência do soro e de IGF-1 e insulina no α -MEMB e α -MEMO de maturação também não altera o desenvolvimento embrionário pós clivagem de oócitos (tabela 4).

A presença de IGF-I, insulina, transferina e selênio no meio α -MEMC, meio de maturação definido, altera o tempo de maturação oocitária, promovendo inibição reversível (tabela 1 e 2) como o também o tempo de produção de embriões (tabela

3). Na tabela 3, a porcentagem de óocitos clivados e de embriões de 8 células é menor, porém a produção de blastocistos, de embriões expandidos e eclodidos é semelhante, quando compara-se o meio definido α -MEMC com o controle TCM-199.



Figura 16: Anestesia para a transferência de embriões produzidos *in vitro*.



Figura 17: Preparação da fêmea receptora para a transferência de embriões produzidos *in vitro*.



Figura 18: Transferência de embriões produzidos *in vitro*.



Figura 19: Diagnóstico de gestação através da palpação retal para identificar a presença do feto.



Figura 20: Diagnóstico de gestação via ultrasson, para visualização do feto.

Fonte: (51)



Figura 21: Bezerros avaliados após o nascimento.



Figura 22: Bezerros avaliados após o nascimento.

Foram transferidos para as fêmeas receptoras aneloradas, um total de 25 embriões produzidos no meio controle (TCM-199). Destes embriões, 10 foram confirmados e diagnosticados a prenhez em 30 dias pós FIV.

Em 90 dias, foi realizada uma avaliação nas 10 receptoras prenhes, via ultrasson, e constatou-se que houve 3 reabsorções (abortos espontâneos), restando apenas 7 receptoras com diagnóstico positivo de prenhez.

Ao final da gestação, das 7 receptoras prenhes, 5 bezerras nasceram naturalmente, e outras 2 foram natimorto.

Os nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura, sendo obtida taxa de 40% de prenhez; 28% de nascimentos e 20% de bezerros saudáveis. Estes dados se considerarmos que, foram utilizadas vacas de leite como doadoras, e sêmen sexado, podem ser considerados tão bons quanto, ou maiores que os dados da literatura para animal de leite.

6 DISCUSSÃO – ANÁLISE CRÍTICA

Resultados da produção de embriões in vitro em meios definidos

Estudos foram conduzidos para analisar os efeitos da MIV em meio quimicamente definido enriquecido com IGF-I, insulina, androstenediona, transferrina e PVA chamado aqui α -MEMC, na ausência de gonadotrofinas, sobre o desenvolvimento pós fertilização de oócitos bovinos.

Em nosso trabalho, verificou-se que, nestas condições de cultura, os oócitos têm o mesmo potencial de desenvolvimento que os maturados no meio padrão (TCM-199), suplementado com FSH. Conseqüentemente, a ausência de soro ou FSH não compromete o desenvolvimento pós-clivagem do oócito, à semelhança do que ocorreu em outro trabalho deste mesmo grupo (20).

Em 2007, Christoph e colaboradores (3; 52) mostrar que a taxa de desenvolvimento de oócitos maturados sem proteínas era semelhante ou superior à de oócitos maturados em presença de soro ou LH, FSH e estradiol.

A presença do soro em meios de maturação é comum, mas ele pode trazer contaminantes para a cultura como bactérias, vírus e prions (20; 52) e seu uso está associado a alterações fenotípicas como o aumento de peso no neonato (20; 52).

O PVA usado em cultura de células estabiliza a pressão osmótica e é um agente protetor e quelante de metais e afeta a adesão celular, absorção de proteínas e difusão de fatores parácrinos e autócrinos (1; 19). A presença de PVA no meio de MIV reduz o desenvolvimento embrionário, principalmente mórula e blastocisto (1). Da mesma forma o desenvolvimento embrionário após clivagem é reduzido quando soro ou BSA é trocado por PVA (37).

Fatores de crescimento são necessários aos meios de MIV quando se usa PVA como por exemplo o EGF (epidermal growth factor) (2). Em nosso experimento utilizamos o IGFI e está mostrado na literatura que o IGF e a insulina aumentam a

maturação de oócitos bovinos (3). O FSH, devido a sua importância na foliculogênese, também é utilizado comumente em meios de MIV. O uso de gonadotrofinas no meio de MIV foi relatado como benéfico (5) e indicado. No entanto, ainda não há um consenso quanto ao uso de gonadotrofinas, pois os resultados obtidos foram controversos (7; 20) mostrando que LH e FSH não alteram a MIV e o subsequente desenvolvimento embrionário (51; 52). Em nossos experimentos, o FSH aumentou a produção de embriões em meio α -MEMB, e não alterou a produção no meio α -MEMO. Sugere-se então que o FSH promova efeitos diversos dependendo da composição do meio de maturação.

Estes resultados são indicativos de retardo, tanto na maturação nuclear (inibida reversivelmente), como na velocidade de produção de embriões. Nesses, apesar da taxa de clivagem e de embriões de 8 células serem menores a taxa de formação de blastocistos e subsequente desenvolvimento em blastocistos expandidos e eclodidos é semelhante, fato indicativo de que apesar do desenvolvimento embrionário ser retardado no α -MEMC, o aproveitamento dos clivados é melhor. Os resultados mostrados na Tabela 1 mostram que a MN é bloqueada (3h) reversivelmente (24h) pela MIV em α -MEMC.

Na tabela 3, observamos que a taxa de clivagem é menor quando utiliza o α -MEMC na MIV, e também um número menor de embriões com 8 células e número menor de blastocistos, neste grupo. No entanto a porcentagem de embriões expandidos e eclodidos é a mesma entre os dois grupos. A taxa de blastocistos e clivados (BL/CL) é semelhante entre os dois grupos e a taxa de blastocistos e oito células (BL/8C) observada no α -MEMC é quase o dobro da observada no meio controle. Isso pode indicar aproveitamento maior dos clivados ou atraso no desenvolvimento embrionário ou a produção de embriões menos ativos metabolicamente, parece ser benéfico para PIVE (53).

A produção *in vitro* de embriões é considerada uma importante ferramenta para o aumento e disseminação de animais de alta e média qualidade genética. O Brasil destaca-se como líder na utilização desta técnica (54). Esta liderança está relacionada à predominância de gado Nelore (*Bos taurus indicus*) no rebanho nacional exatamente pelo maior número de folículos ovarianos e oócitos recuperados por cada sessão de OPU, quando comparados com raças européias

(55). Para garantir o sucesso da PIVE, um aspecto importante refere-se à qualidade das fêmeas receptoras e a eficiência dos protocolos de preparação da mesma, além da previsão com as estimativas dos custos com a sua manutenção.

Em rebanhos leiteiros, mais de 50% das vacas no cio não são detectadas devido a falta de comportamento de acasalamento (54). Este problema é ainda maior quando observada em vacas leiteiras de alta produção usadas como receptoras (55). A não detecção de estro é sem dúvida um grande desafio para os programas que usam o gado com pequena proporção de sangue *Bos indicus* devido ao aumento do estro de curta duração e a elevada incidência de estro à noite (56).

A fim de resolver os problemas relativos a detecção de estro e para aumentar a proporção de animais bem preparados para receber os embriões, vários protocolos foram desenvolvidos, permitindo a transferência de embriões (TE), sem a necessidade de observação de estro. Esses protocolos permitem a transferência de embriões em tempo fixo (TETF), e utilizam hormônios que controlam a dinâmica folicular e lútea e promovem a sincronização do momento da ovulação (57; 58).

Um dos fatores que inviabilizava a PIVE, era a grande distância entre o laboratório de embriões e as fazendas com as receptoras; este problema foi solucionado com o transporte do embrião em incubadoras. Outro problema para a utilização da PIVE era o grande número de bezerros produzidos do sexo não desejado, este problema foi resolvido com a utilização do semen sexado.

O transporte de embriões por distâncias mais longas e a utilização de semen sexado são hoje utilizados em larga escala (59). Uns dos cuidados necessários é a seleção rigorosa do touro e a partida do sêmen para obter resultados mais vantajosos (59). A escolha de uma receptora de qualidade é procedimento desafiador, especialmente em países com número excessivo de embriões transferidos. O bom estado nutricional e de saúde, bem como manejo adequado, são fatores importantes para garantir o sucesso da PIVE. O uso de novilhas como receptoras é normalmente indicado como a melhor opção para alcançar maiores taxas de prenhez. Pesquisadores dizem que as melhores receptoras seriam novilhas cruzadas, geralmente nelore meio-sangue e raças européias com alguma capacidade de produção de leite, tais como simental. No entanto, devido a

fornecimento limitado e procura elevada, este tipo de rebanho se tornou caro e escasso.

Uma alternativa bem sucedida recentemente proposta (60), refere-se à utilização de nelore recém-paridas como receptoras de embriões. Estas fêmeas, são categoricamente mais numerosas no país, sendo facilmente encontradas e com um preço justo. Contradizendo idéias pré-concebidas, esta categoria de animais chega a ter em torno de 40% de taxas de prenhez, com mais de 10.000 filhotes já nascidos (53).

A opção do uso de vacas com bezerros lactentes deve considerar a nutrição e a saúde dos animais, e o fato de que o ciclo estral reiniciar logo depois parto, a tempo de responder aos protocolos de sincronização (37). Se o estado nutricional e de saúde são adequados, a utilização de vacas pode efetivamente apresentar certas vantagens em comparação com as novilhas. Em geral, a utilização de vacas pode gerar melhores resultados, uma vez que elas geralmente apresentam melhor resposta ao protocolo hormonal, e novilhas requerem frequentemente uma pré sincronização. Outro aspecto interessante é que as vacas já foram expostas a agentes patogênicos. Assim, elas podem ter maior resistência à doenças e melhor qualidade do colostro.

Até recentemente, o cuidado em preparar as receptoras estava focado na sua capacidade em responder aos protocolos de sincronização e capacidade de manter a prenhez. No entanto, com os recentes avanços na área de epigenética, tornou-se evidente que a qualidade da dieta e comportamento materno pode interferir na expressão dos genes do bezerro. Apesar do fato de que a sequência genética é estabelecida desde o primeira divisão celular, a expressão de genes pode ser alterada devido a fatores ambientais. Por exemplo, durante a gestação, o estado nutricional da receptora pode interferir na reserva folicular ovariana dos fetos (61), comprometendo o desempenho reprodutivo futuro do neonato, um futuro doador pode ter o seu comprometido se, durante a sua formação fetal, a sua receptora sofreu privação nutricional. Outro aspecto importante dos eventos epigenética refere-se à capacidade materna da receptora (62).

O tratamento mais simples para a sincronização do estro de receptoras baseia-se em uma única administração de PGF, ou em duas injeções de 11 a 14

dias de intervalo. Embora os procedimentos sejam relativamente eficazes e de baixo custo, tratamento com PGF depende da eficiência na detecção do estro, e da resposta do corpo lúteo de animais submetidos ao protocolo. O corpo lúteo (CL) é sensível às PGF apenas a partir do dia 5 até o dia 16 do ciclo estral. Além disso, o momento da aplicação da prostaglandina se dá em um ovário em uma fase determinada da onda folicular, o que difere de animal para animal, resultando em assincronia no início do estro (63), o que afeta negativamente a eficiência da técnica. Nesses casos é adequado sincronizar a ovulação e transferir o embriões em tempo fixo.

Em grandes programas de PIVE, onde a maior parte dos embriões é transferida a fresco, a disponibilidade de maior número de receptoras para protocolos de TETF têm sido cada vez mais solicitada. Em um estudo recente com vacas de leite, Rodrigues e colaboradores (55) compararam uma única aplicação de um protocolo de PGF usando TETF, progesterona, eCG, benzoato de estradiol e estradiol cipionato. Apesar de ter propriedades farmacocinética diferentes, benzoato de estradiol (BE) e cipionato de estradiol (CE) são consideradas eficazes na indução da ovulação em *Bos taurus* e *Bos indicus*. Por ter uma meia-vida mais curta, a BE promove um aumento brusco de LH de maior amplitude e duração mais curta do que CE, resultando em maior sincronia do pico de LH (63). Devido à sua baixa solubilidade em água, BE é liberado mais lentamente e promove um aumento repentino de LH mais duradouro (64).

Estudo indica que protocolos de TETF usando o BE como indutor da ovulação são amplamente utilizados (55). Execução do protocolo BE requer manejo dos animais em quatro diferentes períodos, enquanto que a substituição por CE permite a eliminação de uma manipulação, a redução de custo do trabalho e de tempo. Sales e colaboradores (63) avaliaram o efeito de ambos os medicamentos BE e CE para a indução da ovulação em *Bos indicus* em lactação, submetidas à IATF. Concluíram que, apesar da maior sincronização de pico de LH nos animais que receberam BE, a sincronização da ovulação foi semelhante entre os dois grupos, e o mesmo ocorreu com a fertilidade dos animais expostos a qualquer protocolo.

A administração de eCG no dia 5 de protocolos de sincronização aumenta as taxas de gravidez nas receptoras selecionados para TE (50; 57). Com a finalidade de aumentar o tamanho do folículo ovulatório e induzir única e múltiplas ovulações, este hormônio estimula a produção e fornece uma concentração mais progesterona durante a fase luteal subsequente (65). Uma possível explicação para o melhor desempenho das receptoras que receberam eCG no dia 5 seria que a elevada concentração de progesterona de CL fisiológico junto com progestina liberado do implante pode inibir os pulsos de LH e crescimento folicular (65).

Assim, Ferreira e colaboradores (66) avaliaram o efeito de retardar a administração de eCG do dia 5 ao dia 8, substituindo o implante por progestina vaginal, implante auricular, contendo menos hormônio. Os resultados obtidos mostraram que, quando foram utilizados implantes de orelha, foi possível reduzir o número de animais utilizados sem comprometer a eficiência da sincronização do protocolo (Tabela 5). O protocolo proposto por Ferreira e colaboradores (66), consiste na inserção de um dispositivo de progesterona e administração de EB no dia 0; administração de PGF, eCG, CE e remoção do dispositivo de progesterona no dia 8, e TETF no dia 17. Há também a possibilidade de utilizar dispositivo intravaginal para a liberação de progesterona, com a condição de que uma dose de PGF seja administrada no dia 0 no momento da inserção do dispositivo de progesterona, neste caso somente três manejos são necessários.

A fim de facilitar ainda mais o trabalho diário em programas de TE em grande escala, diferentes durações do dispositivo de progesterona têm sido testados (67). O protocolo de sincronização é iniciado no mesmo dia em todo o grupo de fêmeas (dia 0), com a possibilidade de remover o dispositivo 7, 8 ou 9 dias. É possível iniciar o programa em todos os animais e retirar o implante de um terço do lote, a partir do dia 7 (53). O indutor de ovulação (CE), o agente luteolítico e eCG são aplicadas no mesmo dia da remoção do dispositivo de progesterona (68).

A aquisição e manutenção da receptora no rebanho representa um custo importante na PIVE. As despesas com alimentação e sincronização do estro podem inviabilizar uma transferência de embriões. Portanto, a busca por protocolos de sincronização representam a melhor solução para os programas economicamente viáveis. Da mesma forma, os resultados obtidos são considerados muito

satisfatórios, uma vez que os protocolos atualmente disponíveis são considerados práticos e facilmente aplicados, como o nosso protocolo que envolve somente três manipulações. O TETF é uma alternativa interessante que poderia resultar na obtenção de bons índices de prenhez durante todo o ano, mesmo em vacas de produção de corte e leite (69; 70).

Na tabela abaixo encontram-se resumidos os protocolos mais utilizados atualmente para o preparo das receptoras (53).

Tabela 5 Taxas de transferências e prenhez obtidas em protocolos de vacas como receptoras de PIVE

PROTOCOLO	RAÇA DAS RECEPTORAS	AVALIAÇÃO PREVIA CL	TAXA UTILIZAÇÃO	TAXA PRENHEZ	FONTE
P4e BE+eCG, PGF2 e CE	Holandesa	Sem CL	61,2	38,2	Rodrigues et al. 2010
P4e BE+eCG, PGF2 e CE	Holandesa	Com CL	75	42,9	Rodrigues et al. 2010
P4e BE+eCG (D5)+PGF2 e BE	TaurusXIndicus	Com CL	76,1	31,0	Siqueira et al. 2009
P4eBE+ eCG, PGF2 e CE	TaurusXIndicus	Com CL	96,0	59,0	Ferreira et al. 2006
P4e BE+eCG, PGF2 e CE (D7)	Nelore	Sem avaliação	88,0	43,0	"in vitro" Brasil
P4e BE+eCG, PGF2 e CE (D8)	Nelore	Sem avaliação	88,0	42,0	"in vitro" Brasil
P4e BE+eCG, PGF2 e CE (D9)	Nelore	Sem avaliação	88,0	44,0	"in vitro" Brasil
P4eBE+PGF2(D7)+ eCG e CE (D9)	Nelore	Sem avaliação	61,8	42,1	"in vitro" Brasil
P4eBE+PGF2(D7)+ eCG e CE (D8)	Nelore	Sem avaliação	67,9	37,2	"in vitro" Brasil
P4eBE+PGF2(D7)+ eCG e CE (D8)	TaurusXIndicus	Sem avaliação	73,8	45,4	"in vitro" Brasil

Na última década, a fertilização *in vitro* emergiu como alternativa para a superovulação e tornou-se a técnica de escolha para a produção de embriões bovinos, especialmente em raças zebuínas. O crescimento recente do uso comercial de tecnologias para a produção *in vitro* de embriões no Brasil foi analisada em revisão de Viana e colaboradores (12), embasado em dados obtidos do Comitê de Estatística da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embrião que inclui relatórios de associações de criadores, empresas comerciais de fertilização *in vitro* e profissionais de TE, destacando-se, a evolução da tecnologia, os prós e os contra da técnica e os desafios futuros.

Três períodos diferentes podem ser identificados no histórico da PIVE: 1) os primeiros anos (1999 -2003), quando o crescimento FIV foi impulsionado pelo crescimento da procura do mercado de embriões, embora o tecnologia ainda era considerada como elitista, 2) um período de crescimento exponencial (2003-2006), quando a fertilização *in vitro* superou a TE convencional como técnica de escolha e 3) um período posterior e atual, (2006- o presente momento), quando o números totais de PIVE tendem a se estabilizar e inicia-se o crescimento da aplicabilidade da técnica em raças leiteiras.

Até o final da década de 1990, PIVE no Brasil foi realizada quase apenas para fins de pesquisa e, conseqüentemente, não tinha impacto comercial devido à sua complexidade e alto custo. Em um período de apenas cinco anos, no entanto, o Brasil se tornou o maior produtor mundial de embriões bovinos e referência no uso desta tecnologia.

Investigação sobre PIVE tem sido realizada no Brasil, desde a década de 1980 por várias universidades, centros de pesquisa e, gradualmente, criou uma base sólida de conhecimentos na área. Além de desenvolvimento de protocolos para a *maturação in vitro* MIV, fertilização (FIV), e cultura de embriões (CIV) o processo inteiro necessitava de melhor compreensão e controle da fisiologia reprodutiva em raças zebuínas, e protocolos para a otimização da captação de oócitos por ultrassom (OPU), que é atualmente a técnica de escolha para a obtenção de oócitos imaturos.

No Brasil, nesse mesmo período, a utilização da OPU já apresentava progressos significativos na caracterização de diferentes aspectos da dinâmica folicular em raças zebuínas e no desenvolvimento de protocolos de sincronização de estro usados para preparar receptoras.

Uma atividade bem-sucedida de PIVE comercial começou no Brasil em 1998-1999. Nessa altura, contudo, era consenso quase geral de que esta era uma técnica complementar ou uma alternativa para ser usada em situações específicas, como a de doadoras inférteis (71). Na verdade, a complexidade do processo e o elevado custo dos equipamentos acrescido do também elevado custo da manutenção dos animais e a necessidade de laboratórios com infraestrutura adequada contribuiu para o não entendimento do potencial da PIVE. Desta maneira foi rotulada como elitista, pois se acreditava que era utilizada em animais altamente valiosos.

No período de 2003 a 2006, as transferências de embriões no Brasil ultrapassaram 200.000 embriões transferidos/ano. O processo de PIVE é ainda caracterizado por uma baixa eficiência. Diferentes estudos relataram 70% de recuperação de COC utilizando aspiração folicular via transvaginal em animais não-estimulados (72; 73). De 10 a 40% de embriões produzidos (incluindo a maturação, fertilização e cultura de embriões até o estágio de blastocisto (74; 75; 76). Taxas de prenhes que variam de 30 a 40% (60; 63; 77) e alta incidência de abortos e natimortos (77). Conseqüentemente, a eficiência global, considerando o número de bezeros nascidos em relação aos folículos aspirados, não era superior a 10% (74). Apesar de grande esforço para o desenvolvimento de cada uma das etapas envolvidas na PIVE, ganhos substanciais são limitados, pela qualidade dos COC recuperados (78; 79). Portanto, a eficiência e conseqüente viabilidade econômica de PIVE esta intimamente relacionada com o número de folículos disponíveis para aspiração (OPU) em ovários das doadoras e pela qualidade e potencial de desenvolvimento dos oócitos recuperados.

As fêmeas de raças zebuínas são conhecidas por apresentarem muitas diferenças na fisiologia ovariana comparada com raças européias, incluindo maior número de folículos recrutados em cada onda folicular e maior número de ondas por ciclo ovarianos (14; 69). Essas diferenças também são responsáveis por número maior de folículos em crescimento em todo o ciclo estral e, como conseqüência, mais COCs são recuperados por OPU. Estima-se média de 2,7 prenhez por sessão doador/aspiração, no Brasil. Em contraste, a atividade de PIVE na Europa (54; 71) apresentava produção média de 1,6 embriões por sessão de aspiração considerando taxa de prenhez ao redor de 50%, resultaria em menos de uma gravidez por sessão de aspiração, isto é, menos de um terço do resultado observado no zebu. O número médio europeu de embriões/aspiração é 06:55 COCs

recuperados por doadora, o que está de acordo com as taxas de recuperação de óocitos relatadas em diferentes estudos envolvendo *Bos taurus* (72; 73; 80).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2010, o Brasil teve o maior rebanho bovino comercial do mundo ao redor de 205 milhões de animais e um terço são vacas e novilhas púberes. Este grande rebanho, geneticamente heterogêneo criou enorme demanda por tourinhos (em rebanhos de corte) e novilhas (em rebanhos leiteiros) a cada ano que não puderam ser atendidas por inseminação artificial (IA) ou TE convencional. Neste cenário, a utilidade de tecnologias *in vitro* começou a crescer visando aumentar o número de filhos ou filhas por doadora, em um menor período de tempo (71; 74; 81). O requisito para todo um conjunto de novos conhecimentos e procedimentos resultaram no aparecimento das primeiras empresas focadas apenas nas tecnologias *in vitro* (82).

Após período de crescimento exponencial sustentada, principalmente por raças de corte, a produção de embrião brasileiro mostrou tendência a se estabilizar em cerca de 300.000 transferências/ano. Apesar de raças de corte a serem ainda responsáveis por 78,4% dos embriões transferidos em 2010, avanço notável da PIVE ocorreu principalmente em vacas leiteiras. Enquanto que no nelore (maior raça de carne) houve pequena retração, no uso da PIVE, mas ela expandiu-se cerca de 764% no gir (mais importante raça zebu- leiteiro) (83). Esta aceitação da técnica de PIVE em raças leiteiras pode ser atribuída a utilização do sêmen sexado, revertendo o efeito negativo da geração de maior quantidade de machos observada após fertilização com sêmen convencional (81).

A disponibilidade de sêmen sexado também abriu novo conjunto de possibilidades na indústria de laticínios, principalmente, pela produção de animais mestiços zebu-holandês. A raça leiteira chamada Girolando (Gir x Holandês) é o único cruzamento com significativa participação tanto na TE como na PIVE, responsável por 2,5% do total. É interessante destacar que as tecnologias de embriões podem ser usadas em raças leiteiras, não só para a produção de touros e doadoras, mas, também, para produzir novilhas de reposição para fazendas comerciais (renda principal vem da venda do leite, e não dos animais). Existe pressão constante para a utilização de PIVE em larga escala para a produção de bezerras F1 Gir x Holandês (60). Os animais da primeira geração (F1) podem também ser usados como doadores de óocitos para produzir outros cruzamentos, tal como 3/4 e 1/4 (também utilizada para a produção de 5/8). O desempenho de F1

(1/2) e 1/4 como doadores para a PIVE é próximo ou até mesmo melhor do que o desempenho dos doadores Gir, considerando tanto o número de oócitos recuperados como de embriões produzidos (60). Outra característica interessante deste novo mercado é a utilização de PIVE para produzir F1 e outros cruzamentos de animais de alto mérito genético, como o cruzamento do Gir com doadoras da raça Holandesa, uma estratégia, que resultou no aparecimento de uma nova "Elite" (84).

Segundo Viana e colaboradores (12), apesar do recente aumento no uso de tecnologias *in vitro* em raças leiteiras, há alguns importantes desafios pela frente. A maioria das criações leiteiras não tem área suficiente para manter um rebanho receptor independente, e a utilização de vacas em lactação como receptoras exigiria a utilização de embriões congelados de PIVE, ou um aumento no período de espera, o que provavelmente prejudicaria o intervalo entre partos e/ou distribuição de partos ao longo do ano. Embora algum progresso tenha sido recentemente realizado na metodologia de criopreservação de embriões *in vitro* produzidos, congelados e descongelados representaram apenas em 5 a 6% do total de embriões PIVE transferidos em 2009 (85). A baixa eficiência de procedimentos de criopreservação no Brasil parece estar diretamente relacionada às características inerentes ao *Bos indicus*, uma vez que taxas de prenhez semelhantes foram observadas após TE de embriões-congelados/descongelados e não congelados produzidos em *Bos taurus* (82; 83; 84; 86).

No que se refere à restrição quanto ao número de receptoras disponíveis, uma alternativa seria a segmentação da indústria leiteira, com a produção de novilhas de reposição sendo concentrada em poucos centros especializados, como acontece na criação de suínos (87).

O uso de tecnologias *in vitro* PIVE para produzir animais mestiços após TE podem consolidar a tendência ao crescimento do uso da técnica em rebanhos leiteiro representa o futuro do melhoramento no gado de corte, como já vem acontecendo e a acelerando os ganhos genéticos em rebanhos de leite do País.

7 CONCLUSÕES

Meios de cultura definidos para MIV foram formulados em nosso laboratório: Estes meios são o α -MEMC (INPI sob o número 012080000612) α -MEMB e o α -MEMO. Foram comparados com o controle padrão/comercial M199 ou TCM-199. Em substituição ao SFB existente no meio TCM-199 foi utilizado como macromolécula o PVA. O α -MEMC contém hormônios e fatores de crescimento, que foram retirados do α -MEMB que contém agentes antioxidantes e aminoácidos não essenciais, que foram retirados do α -MEMO.

1) Modificação em processos ou formulações dos meios de cultura para maturação de oócito *in vitro* (MIV) levam tanto no α -MEMC, no α -MEMB e no α -MEMO a mesma taxa de produção de embriões.

2) Foram padronizadas as técnicas *in vivo* de captação de oócitos por sondas auxiliadas por ultrassom (OPU) de doadoras, vacas mestiças produtoras de leite. Nas receptoras aneladas o estro foi sincronizado por protocolo que envolveu somente 3 manipulações. Os embriões produzidos no TCM-199 foram transferidos. Os resultados observados foram semelhantes aos da literatura.

Portanto nosso grupo hoje conta com a metodologia *in vitro* de PIVE (MIV, FIV e CIV), padronizadas e com resultados expressivos, quando se utilizam os meios definidos de interesse tanto para a área acadêmica como para a área aplicada. As metodologias *in vivo* montadas para a transferência de embriões como a OPU, a sincronização de estros em receptoras por protocolos hormonais, a transferência de embriões (TE) e a produção de neonatos em porcentagens semelhantes as da literatura. Este conjunto de técnicas estão disponíveis para estudos futuros.

CONCLUSÃO FINAL

O conhecimento e crescimento da assimilação e aplicabilidade destas técnicas pela população, somente foi possível graças ao enorme esforço conjunto da área acadêmica (pesquisa) com a necessidade que emerge cada vez mais forte no setor comercial (produtores rurais e companhias de PIVE). As potenciações na união destes setores levaram o Brasil a ser o 1º produtor mundial de embriões em animais produtores de carne (zebu) e hoje com interesse crescente na produção do leite (girolandos).

Enquanto no passado estas técnicas eram utilizadas para suprir as necessidades de grandes produtores, hoje clama-se pela distribuição das mesmas para pequenos e médios produtores o que será possível graças à diminuição dos custos que devem ser consequência de trabalhos científicos e do apoio governamental.

REFERÊNCIAS

- 1- Sirard M A, Blondin P. Oocyte Maturation And Ivf. In Cattle. *Animal Reproduction Science*, V. 42, P. 417-426. 1996.
- 2 - Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte Growth, Capacitation And Final Maturation In Cattle. *Theriogenology*, V. 47, P. 23-32. 1997.
- 3 - Pincus G, Enzmann E V. The Comparative Behavior Of Mammalian Eggs *In Vivo* And *in vitro*. I. The Activation Of Ovarian Eggs. *The Journal Of Experimental Medicine*, V. 62, P. 655–675. 1935
- 4 - Byskov A G, Andersen C Y, Hossaini A, Guoliang X. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. *Molecular Reproduction and Development*, v. 46, p. 296-305. 1997.
- 5 – Edwards R G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, sig, rhesus, monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, v. 208, p. 349-351. 1965.
- 6 - Sirard M A, Desrosier S, Assidi M. *In Vivo* And *in vitro* Effects Of Fsh On Oocyte Maturation And Developmental Competence. *Theriogenology*, V. 68, P. 71–76. 2007.
- 7 - Fair T, Hulshof S, Hyttel P, Greve T, Boland M. Nucleus Ultrastructure And Transcriptional Activity Of Bovine Oocytes In Preantral And Early Antral Follicles. *Molecular Reproduction And Development*, V. 46, P. 208-215. 1997.
- 8 - Wu B, Ignatz G G, Currie B, Yang X. Temporal Distinctions In The Synthesis And Accumulation Of Proteins By Oocytes And Cumulus Cells During Maturation *in vitro* Of Bovine Oocytes. *Molecular Reproduction And Development*, V. 45, P. 560-565. 1996.

- 9 - Brevini T A, Cillo F, Antonini S, Gandolfi F. Cytoplasmic Remodelling And The Acquisition Of Developmental Competence In Pig Oocytes. *Animal Reproduction Science*, V. 98, P. 23-38. 2007.
- 10 - Machalkova M, Krausova K, Josekova E, Tomanek M. Developmental Of Bovine Oocytes: Effects Of Follicle Size And The Phase Of Follicular Wave On *in vitro* Embryo Production. *Theriogenology*, V. 61, P. 329-335. 2004.
- 11 - Viana J H M, Siqueira L G B, Palhao M P, Camargo L S A. Features and perspectives of the Brazilian “in vitro” embryo industry. *Animal Reprod.*, v.9, p. 12-18, Jan/Mar 2012.
- 12 - Gilchrist R B, Ritter L J, Myllymaa S, Kaivo-Oja N, Dragovic R A, Hickey T, Ritvos O, Mottershead D G. Molecular basis of oocyte paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *Journal of Cell Science*, v. 119, p. 3811-3821, 2006.
- 13 - Viana J H M, Ferreira A M, Sá W F, Camargo L S A. Follicular dynamics in Zebu cattle. *PAB*, v. 35, p. 2501-2509, 2000.
- 14 - Piccinato C A. Efeito *in vitro* de catecolaminas em células da granulosa de folículos ovarianos bovinos, produtoras de 17 β -estradiol. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP, 2002.
- 15 – Vasconcelos R B, Salles L P, Oliveira e Silva I, Gulart L V M, Souza D K, Torres F A T G, Bocca A A L, Rosa e Silva A A M. Culture of bovine ovarian follicle wall section in defined and non defined médium. *Brazilian J. Of Medical and Biological Research*. Em publicação 2013.
- 16 - Gong J G, Mc Bride D M, Bramley T A, Webb R W. Effects Of Recombinant Bovine Somatotrophin Insulin-Like Growth Factor-1 And Insulin On Bovine Granulosa Cell Steroidogenesis *in vitro*. *Journal Of Endocrinology*, V. 143, P. 157-164. 1994.

17 -Oliveira E Silva I. Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos *cumulus oophorus* bovinos co-cultivados com hemi-seções foliculares em meio de cultura definido. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília/Faculdade de Medicina, 2008.

18 - Oliveira E Silva I, Vasconcelos R B., Caetano J V ; Gulart L V M, Camargo L S A, Bao S N., Rosa E Silva A A M. Induction Of Reversible Meiosis Arrest Of Bovine Oocytes Using A Two-Step Procedure Under Defined And Non Defined Conditions. *Theriogenology*, V. 75, P. 1115-1124, 2011.

19 - Gulart L V M. Efeito do FSH adicionado aos meios de maturação oocitária sobre o desenvolvimento precoce de embriões bovinos. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília/Faculdade de Medicina, 2009.

20 - Vireque A A, Camargo L S A, Serapião R V, et al. Preimplantation Development And Expression Of Hsp-70 And Baxgenes In Bovine Blastocysts Derived From Oocytes Matured in Alpha Mem Supplemented With Growth Factors And Synthetic Macromolecules. *Theriogenology*, V. 71, P. 620-627. 2009.

21 - VASCONCELOS R B. Caracterização morfofuncional das células somáticas de folículo ovariano bovino, cultivado em meio de cultura definido, não indutor de luteinização. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília/Faculdade de Medicina, 2008.

22 - Campbell B K. Inhibin Oestradiol And Progesterone Production by Ovine Granulosa Cells *in vitro*. *Journal Of Reproduction And Fertility Abstract Series*, V. 3 Abstract 37, 1989.

23 - Lonergan P, Carolan C, Mermillod P. Development Of Bovine Embryos *in vitro* Following Oocyte Maturation Under Defined Condition. *Reprod. Nutr. Dev.*, V. 34, P. 329-39. 1994.

24 - Olar T T, Potts A S. Effect Of Fetal Bovine Serum Of Different Gestational Ages On Mouse Embryo Growth And Development. *J Assist Reprod Genet*, V.10, N 3, Apr, P. 236-8. 1993.

25 - Montrezor L H. Esteroidogênese Em Ovários Bovinos: Estudo *in vitro* Dos Efeitos Da Endotelina-1, Angiotensina-li E Peptídeo Natriurético Atrial Na Dominância E Atresia De Células Da Granulosa Produtoras De Estradiol. Tese de Doutorado. Faculdade De Medicina De Ribeirão Preto - Usp. 2002.

26 - Collares C V A, Rosa E Silva A A M. Granulosa Cells Culture In Chemically Defined Medium: Is There Mimicry Between Those Cells And The Cells Of Dominant Follicle And/Or Preovulatory Follicle. *Biology Of Reproduction*, V. 68, P. 319-320. 2003.

27 - Viana J H M, Camargo L S A. A Produção De Embriões Bovinos No Brasil: uma nova realidade. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35, p. 915-919. 2007.

28 - Vireque A A, Sa V F, Viana J H M, Camargo L S, Silva M V B, Rosa E Silva A A M. . Estradiol 17 Producers Granulosa Cells Inhibit Meiosis Resumption Of Bovine Oocytes Under Chemically Defined Conditions. In: Sbfis/Alacf P. 364,, Ribeirão Preto. Resumos Alacf, 2003.

29 - Rosa E Silva A A M, Piccinato C A, Montrezor L H. Polyvinyl Alcohol Is Effective In A Defined Media Long-Term Bovine Granulosa Cell Culture In The Maintaince Of 17 Beta-Estradiol Production. In: Ssr Society For The Study Of Reproduction, 2002.

30 - Gutiérrez C G, Campbell K, Webb R. Development Of A Long-Term Bovine Granulosa Cell Culture System: Induction And Maintenance Of Estradiol Production, Response To Follicle- Stimulating Hormone, And Morphological Characteristics. *Biology Of Reproduction*, 56: 608-616, 1997.

31 - Freshney R I. *Culture Of Animal Cells*. A Manual Of Basic Technique. Fourth Edition, 600 P, 2000.

- 32 - Webb R, Mc Bridge. D. Control Of The Proliferation Of Granulosa Cells From Small Ovine Follicles. *Journal Of Reproduction And Fertility Supplement*, V. 43, P. 229-230. 1990.
- 33 - Jeong Yw, Hossein Ms, Bhandari Dilip P, Kim Yw, Kim Jh, Park Sw, Eugene L, Park Sm, Jeong Yi, Lee Jy, Sue K, Hwang Ws. Effects Of Insulin–Transferrin–Selenium In Defined And Porcine Follicular Fluid Supplemented Ivm Media On Porcine Ivf And Scnt Embryo Production. *Anim Reprod Sci*, V. 106, P. 13-24. 2008.
- 34 - Lonergan P, Carolan C, Van Langendonckt A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P. Role Of Epidermal Growth Factor In Bovine Oocyte Maturation And Preimplantation Embryo Development *in vitro*. *Biol Reprod.*, V. 54, P. 1420-1429. 1996.
- 35 - Beker A R C L, Colenbrander B, Bevers M M. Effect Of 17 β -Estradiol On The *in vitro* Maturation Of Bovine Oocytes. *Theriogenology*, V. 58, P. 1663-1673. 2002.
- 36 - Brackett B G, Bousquet D, Boice M L, Dona Vick W J, Ev Ans J F, Dressel M A. Normal Development Following “in vitro” Fertilizations In The Cow. *Bioi. Reprod.* V 27, P. 147-158. 1982.
- 37 - Langhout D J, Spicer L J, Geisert R D. Development Of A Culture System For Bovine Granulosa Cells: Effects Of Growth Hormone, Estradiol And Gonadotrophins On Cell Proliferation Steroidogenesis And Protein Synthesis. *Journal Of Animal Science*, V. 69, P. 3321-3334. 1991.
- 38 – Mota G B, Oliveira e Silva I, Tuany F, Munck M P, Camargo L S A, Rosa e Silva A A M. Insulin increases developmental competence of bovine oocytes cultured in alpha MEM. Submetid to *Zygote* 2013.
- 39 - Wasielak M., Bogacki M. Apoptosis Inhibition By Insulin-Like Growth Factor (Igf)-I During *in vitro* Maturation Of Bovine Oocytes. *J Reprod Dev.*, V. 53, P. 419–426. 2007.

- 40 - Fouladi-Nashta Aa, Campbell Khs. Dissociation Of Oocyte Nuclear And Cytoplasmic Maturation By The Addition Of Insulin In Cultured Bovine Antral Follicles. *Reproduction*, V. 131, P. 449-460. 2006.
- 41 – Thibier M. New records in the numbers of both *in vivo*-derived and *in vitro*-produced bovine embryos around the world in 2006. *Embryo Transfer Newsletter*, v. 25. 2007.
- 42 - Camargo L S A, Viana J H M, Sá W F, Ferreira A M, Ramos A A, Vale Filho V R. Factors Influencing *in vitro* Embryo Production. *Animal Reproduction*, V. 3, P. 19-28. 2006.
- 43 - Sirard M A, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution Of The Oocyte To Embryo Quality. *Theriogenology*, V. 65, P. 126-136. 2006.
- 44 – Wrenzycki C, Herrman D, Niemann H. Messenger Rna In Oocytes And Embryos In Relation To Embryo Viability. *Theriogenology*, 68s, P. S77-S83. 2007.
- 45 - Rheingantz, Maria Gabriela T. Quem Somos. Disponível Em:< [Http://Minerva.Ufpel.Edu.Br/~Mgrheing/Quem_Somos.Htm](http://Minerva.Ufpel.Edu.Br/~Mgrheing/Quem_Somos.Htm)>. Acesso Em: 05 de Agosto de 2007.
- 46 - Fernandes, C. A. C.Cuidados Com O Diagnóstico E Com A Fêmeas Gestantes. 2006. Disponível Em: <[Http://Www,Beefpoint.Com.Br](http://Www,Beefpoint.Com.Br)>.Acesso Em 2 Out. 2006a.
- 47 - Ali A, Coenen K, Bousquet D, Sirard M A. Origin Of Bovine Follicular Fluid And Its Effect During *in vitro* Maturation On The Developmental Competence Of Bovine Oocytes. *Theriogenology*, 62: 1596-1606, 2005.
- 48 - Crozet N, Huneau D, Desmedt V, Theron 'M, Szlolloosi D, Torres S, Sevellec C. “in vitro” Fertilization With Normal Development In The Sheep.
- 49 - Looney C R, Nelson J S, Schneider H J, et al. Improving Fertility In Beef Cow Recipients. *Theriogenology*, V. 65, P. 201-209. 2006.

- 50 - Vynckier L, Debackere M, De Kruif A, Coryn M. Plasma Estradiol-17 β Concentrations In The Cow During Induced Estrus And After Injection Of Estradiol- 17 β Benzoate And Estradiol-17 β Cypionate: A Preliminary Study. *J Vet Pharmacol Ther*, 13:36-42. 1990.
- 51 – Thibier M. Transfers Of Both In Vivo-Derived And “in vitro” Produced Embryos In Cattle Still On The Rise And Contrasted Trends In Other Species In. *IETS Newsletter*, 24:11-19. 2006.
- 52 - Christoph G B, Dermot G M, Joseph M S, Henry J. L. The Quiet Embryo Hypothesis: Molecular Characteristics Favoring Viability. *Molecular Reproduction And Development*. 74:1345–1353. 2007.
- 53 - Van Eerdenburg F J, Karthaus D, Taverne M A, Merics I, Szenci O. The Relationship Between Estrous Behavioral Score And Time Of Ovulation In Dairy Cattle. *J Dairy Sci*, 85:1150-1156. 2002.
- 54 – Seneda M M, Marinho L S R, Untura R M, Morotti F, Moino L L, Rigo A G, Sanches B V, Pontes J H F. Large-scale programs for recipients of *in vitro*-produced embryos. *Anim Reprod*, v.9, n.3, p.323-328, Jul./Sept. 2012.
- 55 - Rodrigues C A, Teixeira A A, Ferreira R M, Ayres H, Mancilha R F, Souza A H, Baruselli P S. Effect Of Fixed-Time Embryo Transfer On Reproductive Efficiency In High-Producing Repeat-Breeder Holstein Cows. *Anim Reprod Sci*, 118:110-117. 2010.
- 56 - Bó G A, Baruselli P S, Martinez M F. Pattern And Manipulation Of Follicular Development In *Bos Indicus* Cattle. *Anim Reprod Sci*, 78:307-326, 2003.
- 57 - Bó G A, Baruselli P S, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R. The Control Of Follicular Wave Development For Self-Appointed Embryo Transfer Programs In Cattle. *Theriogenology*, 57:53-72. 2002.

58 - Nasser L F, Reis E L, Oliveira M A, Bó G A, Baruselli P S. Comparison Of Four Synchronization Protocols For Fixed-Time Bovine Embryo Transfer In *Bos Indicus X Bos Taurus* Recipients. *Theriogenology*, 62:1577-1584. 2004.

59 - Pontes J H F, Silva K C F, Basso A C, Ferreira C R, Santos G M G, Sanches B V, Porcionato J P F, Vieira P H S, Faifer F S, Sterza F A M, Schenk J L, Seneda M M. Large-Scale “in vitro” Embryo Production And Pregnancy Rates From *Bos Taurus*, *Bos Indicus*, And *Indicus-Taurus* Dairy Cows Using Sexed Sperm. *Theriogenology*, 74:1349-1355. 2010.

60 - Pontes J H F, Nonato-Junior I, Sanches B V, Ereno- Junior J C, Uvo S, Barreiros T R, Oliveira J A, Hasler J F, Seneda M M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and “in vitro” methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, 71:690-697. 2009.

61 - Ireland J J, Smith G W, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger J K, Ireland J H L, Mossa F, Lonergan P, Evans A C O. Does Size Matter In Females? Na Overview Of The Impact Of The High Variation In The Ovarian Reserve On Ovarian Function And Fertility, Utility Of Anti-Mullerian Hormone As A Diagnostic Marker For Fertility And Causes Of Variation In The Ovarian Reserve In Cattle. *Reprod Fertil Dev*, 23:1-14. 2011.

62 - Weaver I C G, Cervoni N, Champagne F A, D`Alessio A C D, Sharma S, Seckl J R, Dymov S, Szyf M, Meaney M J. Epigenetic Programming ByMaternal Behavior. *Nat Neurosci*, 7:847-854. 2004.

63 - Sales J N S, Carvalho J B P, Crepaldi G A, Cipriano R S, Jacomini J O, Maio J R G, Souza J C, Nogueira G P, Baruselli P S. Effects Of Two Estradiol Esters (Benzoate And Cypionate) On The Induction Of Synchronized Ovulations In *Bos Indicus* Cows Submitted To A Timed Artificial Insemination Protocol. *Theriogenology*, 78:510-516. 2012.

64 - Reis E L, Nasser L F T, Menegatti J A, Resende L F, Mantovani A P, Baruselli P S. Effect Of Time And Dose Of Ecg Treatment In *Bos IndicusxBos*

Taurus Recipients Treated With Progesterone For Timed Embryo Transfer. *In: Abstracts Of The 15th International Congress Of Animal Reproduction*, Porto Seguro, BA, Brazil. ICAR. Pp. 395. 2004.

65 - Baruselli P S, Ferreira R M, Sá Filho M F, Nasser L F T, Rodrigues C A, Bó G A. Bovine Embryo Transfer Recipient Synchronization And Management In Tropical Environments. *Reprod Fertil Dev*, 22:67-74. 2010.

66 - Ferreira R M, Rodrigues C A, Ayres H, Mancilha R F, Franceschini P H, Esper C R, Baruselli P S. Effect Of Synchronizing Ovulation In Cattle Administered A Norgestomet Ear Implant In Association With Ecg And Estradiol Treatments On Pregnancy Rate After Fixed-Time Embryo Transfer. *Anim Reprod*, 3:370-375. 2006.

67 – Chang M C. Fertilization of rabbit ova “in vitro”. *Nature*, 184:466-467. 1959. *Gamete Res*. V 16. P. 159-170, 1987. *Theriogenology*, 59:651-674. 2003. industry and animal production. *Acta Sci Vet*, 38:s661-s674. 2010b. cattle. *Theriogenology*, 65:77-88. 2006. bovine oocytes. *Biol Reprod*, 66:38-43. 2002.

68 - Rubin M I B. Histórico dos 20 anos da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (1985-2005). *Acta Sci Vet*, 33: 35-54. 2005.

69 - Figueiredo R A, Barros C M, Pinheiro O L, Soler J M. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, 47:1489-1505. 1997.

70 - Baruselli P S, Sá Filho M F, Martins C M, Nasser L F, Nogueira M F, Barros C M, Bó G A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus*

71 - Thibier M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod Nutr Dev*, 45:235-242. 2005.

72 - Seneda M M, Esper C R, Garcia J M, Oliveira J A, Vantini R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim Reprod Sci*, 67:37-43. 2001.

73 - Viana J H M, Camargo L S A, Ferreira A M, Sa W F, Fernandes C A C, Marques Junior A P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Anim Reprod Sci*, 84:1-12. 2004.

74 - Van Wagendonk-de Leeuw A M. Ovum pick up and "in vitro" production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*, 65:914-925. 2006.

75 - Lonergan P, Fair T. "in vitro"-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology*, 69:17-22. 2008.

76 - Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, de La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A. Consequences of "in vitro" culture conditions on embryo development and quality. *Reprod DomestAnim*, 43:44-50. 2008.

77 - Peterson AJ, Lee RS. Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology*, 59:687-697. 2003.

78 - Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard M A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent

79 - Merton J S, de Roos A P, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos P L, Dieleman S J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry.

80 - Sartorelli E S, Carvalho L M, Bergfelt D R, Ginther O J, Barros C M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, 63:2382-2394. 2005.

81 - Viana J H M, Siqueira L G B, Palhão M P, Camargo L S A. Use of “in vitro” fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo

82 - Gimenes L U, Sá Filho M F, Carvalho N A, Torres Júnior J R, Souza A H, Madureira E H, Trinca L A, Sartorelli E S, Barros C M, Carvalho J B, Mapletoft R J, Baruselli P S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, 69:852-858. 2008.

83 - Lopes AS, Martinussen T, Greve T, Callesen H. Effect of days post-partum, breed and ovum pickup scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. *Reprod Domest Anim*, 41:196-203. 2006.

84 - Gibbons J R, Beal W E, Krisher R L, Faber E G, Pearson R E, Gwazdauskas F C. Effects of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, 42:405-419. 1994.

85 - Goodhand K L, Watt R G, Staines M E, Hutchinson J S, Broadbent P J. In vivo oocyte recovery and “in vitro” embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, 51:951-961. 1999.

86 - Merton JS, Ask B, Onkundi DC, Mullaart E, Colenbrander B, Nielen M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up-“in vitro” production embryoproduction program. *Theriogenology*, 72:885-893. 2009.

87 - Ferry L, Mermillod P, Massip A, Dessy F. Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. *Theriogenology*, 42:445-453. 1994.