

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Bioteecnologias da Reprodução Animal: maturação e vitrificação de óocitos, PIV e clonagem

Victor Costa Pereira Fonseca

Pelotas, 2012

VICTOR COSTA PEREIRA FONSECA

Bioteecnologias da Reprodução Animal: maturação e vitrificação de oócitos, PIV e clonagem

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador do Estágio: Prof. Dra. Margot Alves Nunes Dode

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Tiago Veiras Collares

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

F676b Fonseca, Victor Costa Pereira

Biotecnologias da reprodução animal : maturação e vitrificação de oócitos, PIV e clonagem / Victor Costa Pereira Fonseca ; orientador acadêmico Tiago Veiras Collares; orientador de estágio Margot Alves Nunes Dode. Pelotas,2012.53f.: il - Monografia (Conclusão de Curso em Biotecnologia) –Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1.Bovino 2.Cultivo 3.Embriões 4.FIV 5.AMPc
6.Aspiração folicular 7.Coloração I.Collares, Tiago
Veiras(orientador) II .Dode, Margot Alves Nunes(orientador)
III.Título.

CDD 636.0824

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Deschamps, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Vinicius Farias Campos, Universidade Federal de Pelotas

Dr.^a Priscila Marques Moura de Leon

Dedico este trabalho de conclusão de curso à minha família. Sem eles, não teria chegado até aqui.

Agradecimentos

À minha família, Maria de Lourdes Fonseca, José Manuel Fonseca e Marcio Fonseca.

Ao meu orientador acadêmico, Prof. Tiago Collares, por seu apoio e orientação.

À minha orientadora de estágio, Prof.^a Margot Dode por ter me proporcionado a oportunidade de estágio no Laboratório de Reprodução Animal.

Ao Prof. Luciano Pinto pela oportunidade do meu primeiro estágio.

À Prof. Luciana Dode pela indicação e auxílio na escolha do local do estágio.

Aos meu colegas pelos quatro anos convividos durante esta caminhada. Vocês ficarão na minha memória e no meu coração para sempre.

Ao meu colega Fernando Alvez, pelo companherismo até o fim do curso, nas horas boas e ruins.

Aos mestrandos Ana Luiza Guimarães e Sidney Pereira, pelos ensinamentos e pela paciência durante todo o período do estágio.

Ao pessoal do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Cenargen.

À família que me acolheu durante todo o meu período de estágio e mais um pouco.

À todos aqueles que de alguma forma estiveram juntos durante este período, e que não tiveram os nomes citados nestas linhas. Tenham certeza que lhes sou muito grato.

Resumo

FONSECA, Victor C. P. **Biotecnologias da Reprodução Animal: maturação e vitrificação de oócitos, PIV e clonagem**. 2012. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

O estágio curricular supervisionado ocorreu no Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da Embrapa Cenargen, localizada no município de Brasília – DF, transcorrendo de abril a junho de 2012, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Margot Alves Nunes Dode. O estágio foi focado na área de Biotecnologias da Reprodução Animal, possibilitando a realização e o acompanhamento de diversas técnicas desta área em bovinos e atividades relacionadas ao assunto, como aspiração folicular de ovários, PIV de embriões bovinos, avaliação dos embriões cultivados *in vitro*, coloração de oócitos para avaliação de maturação nuclear, coloração de embriões para contagem de células, dissecação de ovários para obtenção de folículos ovarianos, acompanhamento de vitrificação de oócitos, acompanhamento de clonagem por transfência nuclear de célula somática e participação no Journal Club. Além disso, foi escrita uma breve revisão sobre a maturação de oócitos bovinos, com ênfase em retenção meiótica para o aumento da competência oocitária e conseqüentemente da taxa de embriões.

Palavras-chave: AMPc, aspiração folicular, FIV, embriões, cultivo, bovino, coloração.

Abstract

FONSECA, Victor C. P. **Biotecnologias da Reprodução Animal: maturação e vitrificação de oócitos, PIV e clonagem**. 2012. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

The internship occurred in the Laboratório de Reprodução Animal (LRA) of Embrapa Cenargen, located in Brasília – DF, spending from April to June of 2012, under the supervision of Prof. Dr. Margot Alves Nunes Dode. The internship was focused in the area of Biotechnology of Animal Reproduction, enabling the execution and following of various techniques in this area in bovines and activities related to the subject, such as ovarian follicular aspiration, IVP bovine embryos, evaluation of embryos cultured *in vitro* staining of oocytes for evaluation nuclear maturation, staining of embryos for cell count, dissection of ovaries to obtain ovarian follicles, observation of oocyte vitrification and observation of cloning by somatic cell nuclear transfers, and participation in Journal Club. In addition, a brief review on maturation of bovine oocytes, with an emphasis on retention of meiosis to increase the competence of oocytes and consequently the rate of embryo.

Keywords: AMPc, follicle aspiration, IVF, embryo cultivation, bovine, staining.

Lista de Figuras

Figura 1	13
Figura 2	26
Figura 3	28
Figura 4	29
Figura 5	33
Figura 6	35
Figura 7	36
Figura 8	38

Lista de Tabelas

Tabela 1	43
Tabela 2	43

Lista de Abreviaturas e Siglas

μm – Micrômetro

μL – Microlitro

AC – Adenil ciclase

AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina

ATP – Trifosfato de adenosina

CCO – Complexo cumulus oócito

Cenargen – Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPV – Espaço perivitelino

FIV – Fecundação *in vitro*

FSH – Hormônio folículo estimulante

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

GVBD – Rompimento da vesícula germinativa

ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide

LH – Hormônio luteinizante

LRA – Laboratório de Reprodução Animal

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

MIV – Maturação *in vitro*

mL – Mililitro

MPF – Fator de promoção da maturação

nm – Nanômetro

OPU – ovum pick-up

PHE – Penicilamina, hipotaurina, epinefrina

PIV – Produção *in vitro*

RNA – Ácido ribonucleico

RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro

SCNT – Transferência nuclear de célula somática

SFB – Soro fetal bovino

SOF – Flúido sintético de oviduto

VG – Vesícula germinativa

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Abreviaturas e Siglas

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Maturação oocitária	16
3.1.1 Introdução	16
3.1.2 Maturação nuclear e citoplasmática	17
3.1.3 Retenção meiótica	21
3.1.4 Conclusão	22
4 RELATÓRIO	24
4.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIV) bovinos.....	24
4.1.1 Introdução	24
4.1.2 Etapas da PIV	25
4.1.2.1 Aspiração folicular	27
4.1.2.2 Rastreamento e seleção de oócitos.....	28
4.1.2.3 Maturação <i>in vitro</i>.....	30

4.1.2.4 Fecundação in vitro.....	31
4.1.2.5 Cultivo in vitro	33
4.1.2.6 Avaliação de clivagem	34
4.1.2.7 Avaliação embrionária	35
4.2 Avaliação da maturação nuclear	36
4.3 Coloração de embriões	37
4.4 Vitrificação de oócitos.....	38
4.4.1 Introdução	38
4.4.2 Metodologia.....	39
4.5 Clonagem por transferência nuclear de célula somática	40
4.5.1 Introdução	40
4.5.2 Metodologia.....	40
5 RESULTADOS.....	42
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

O Estágio Curricular foi realizado no período de 16 de Abril a 20 de Junho de 2012, junto ao Laboratório de Reprodução Animal do Prédio de Biotecnologia, localizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa Cenargen) (Figura 1), na cidade de Brasília-DF. Totalizando 360 horas de estágio curricular.



Figura 1. Embrapa Cenargen.

No Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia a produção *in vitro* de embriões (PIV) é utilizada em várias pesquisas visando o aprimoramento, o monitoramento e o emprego desta técnica para o suporte a outras biotécnicas como a maturação oocitária, fecundação, desenvolvimento embrionário, criopreservação de oócitos, avaliação *in vitro* da fertilidade de touros, sexagem de sêmen, injeção intracitoplasmática de espermatozoides, clonagem e transgenia.

Os estudos sobre PIV pelo LRA tiveram início em 1990 e, já em 1994 a equipe de seus cientistas e colaboradores obteve o primeiro produto gerado *in vitro*. Em 1996 nasceram os primeiros terneiros por aspiração folicular associada à fertilização *in vitro* (FIV), e em 2000 um produto obtido *in vitro* a partir de oócito procedente de punção folicular de uma fêmea pré-púbere com três meses de idade (EMBRAPA/CENARGEN, 2010).

Durante o período de estágio no Laboratório de Reprodução Animal, foram desenvolvidas atividades como manutenção e esterilização de materiais utilizados nas rotinas do laboratório, preparo de soluções, aspiração folicular de ovários oriundos de abatedouros com auxílio de bomba a vácuo, PIV de embriões bovinos, avaliação dos embriões cultivados *in vitro*, coloração de oócitos para avaliação de maturação nuclear, coloração de embriões para contagem de células, dissecação de ovários para obtenção de folículos ovarianos, acompanhamento de vitrificação de oócitos, acompanhamento de clonagem por transfência nuclear de célula somática e participação no Journal Club onde foram apresentados artigos sobre o reprodução, epigenética e transgenia animal.

2 OBJETIVO

O estágio foi realizado a fim de aprimorar os conhecimentos técnicos e científicos sobre o tema reprodução animal em bovinos, gerando qualificação e capacitação profissional para a atuação nesta área.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Maturação oocitária

3.1.1 Introdução

A meiose é o processo pelo qual células germinativas diplóides dividem-se para produzir gametas haplóides para a reprodução sexual (COHEN & POLARD, 2001).

Oócitos de mamíferos ficam retidos em prófase I da meiose durante a vida fetal. O reinício da meiose no oócito ocorre *in vivo*, em resposta ao aumento de gonadotrofinas ou *in vitro*, em resposta à retirada do oócito do ambiente folicular (WEHREND & MEINECKE, 1998).

A foliculogênese, por sua vez inicia-se com a formação dos folículos primordiais, quando uma única camada de células pavimentosas (células pré-granulosas) se posiciona em torno do oócito primário em torno de 90 dias de gestação em bovinos (MEYES, 2002). Esta estrutura tem em torno de 40µm de diâmetro, contendo um oócito de cerca de 30µm (PICTON, 2001). Em seguida, essas células passam por mudanças e tornam-se cubóides (células da granulosa) dando origem ao folículo primário. Posteriormente, inicia-se a formação das gap junctions (junções comunicantes) entre as células da granulosa e o oócito. Cerca de 210 dias de gestação, as células foliculares multiplicam-se por mitose e origina o folículo secundário, apresentando pelo menos duas camadas de células da granulosa e oócito de 50-60 µm (HYTELL, 1997). A formação de uma cavidade (antro) preenchida com um líquido é característica dos folículos antrais. O líquido do antro serve como uma importante fonte de substâncias regulatórias derivadas de

secreções das células foliculares, como esteróides, enzimas, proteinoglicanas, lipoproteínas e fatores de crescimento. Oócitos podem alcançar cerca de 120 μm em folículos antrais, com capacidade de retomar a meiose. Em bovinos a competência meiótica é adquirida em folículos com cerca de 3mm e oócito de 110 μm . (VAN DEN HOURK & ZHAO, 2005).

A fase de crescimento do oócito não caracteriza-se apenas pelo aumento de seu tamanho, mas também pelo aumento na quantidade de organelas e pela modificação da distribuição e morfologia das mesmas (HYTELL, 1997). O oócito também sintetiza ativamente e armazena RNA (ácido ribonucléico) e proteínas essenciais para a futura maturação, fecundação e início do desenvolvimento embrionário.

A etapa que corresponde à fase final de crescimento e início da maturação *in vivo* após o aumento da frequência dos pulsos de LH (Hormônio Luteinizante) denomina-se capacitação oocitária (HYTELL, 1997). Nesse período, onde a síntese de RNA praticamente é cessada, ocorrem modificações ultraestruturais para a futura aquisição da competência do oócito e desenvolvimento de um embrião viável. Define-se como maturação oocitária o período posterior ao aumento dos pulsos de LH, quando o oócito retoma a meiose e passa por diversas modificações que o torna apto a ser fecundado por um espermatozóide. A complexidade de eventos relacionados durante a maturação do oócito depende não só da correta dinâmica da separação dos cromossomos na maturação nuclear, mas também da distribuição das organelas citoplasmáticas e do acúmulo de RNAm, proteínas e fatores de transcrição, necessários para que o processo se realize (FERREIRA et al., 2008).

3.1.2 Maturação nuclear e citoplasmática

A maturação nuclear e a maturação citoplasmática, apesar de serem eventos distintos, são processos interligados e que ocorrem de modo simultâneo em determinados momentos. Neste sentido considera-se a maturação um ponto chave

na PIV, pois o oócito depende da aquisição da competência para que possa prosseguir nas etapas subsequentes (FIV e CIV).

A maturação nuclear caracteriza-se pelo processo de reversão do primeiro bloqueio meiótico e progride até metáfase II (MII) (MINGOTI, 1995). *In vivo*, a retomada da meiose é iniciada pelo pico pré-ovulatório, com o pulso de LH e ocorre apenas em oócitos totalmente competentes de folículos dominantes. Após o período pré-ovulatório, as células do *cumulus* que envolvem o oócito possuem projeções que penetram a zona pelúcida (ZP) até o citoplasma, que são as gap junctions, onde começam a perder a comunicação celular, levando a uma série de modificações no oócito (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

A maturação nuclear é marcada pela quebra da vesícula germinativa – VGBD (do inglês, *vesicle germinal break down*), condensação dos cromossomos, incluindo consecutivas divisões – metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), completando a primeira divisão meiótica, passando rapidamente para MII da segunda divisão meiótica, havendo novamente o bloqueio do ciclo celular até a fecundação (SIRARD, 2001).

Na maturação citoplasmática ocorrem processos altamente complexos que envolvem vários eventos simultâneos, como a síntese de proteínas, modificações moleculares, migração e reorganização de organelas. É bem estabelecido que folículos respondem ao pico pré-ovulatório de LH, com mudanças na produção de esteróides pelas células da granulosa, antes predominantemente estrogênica para um ambiente progesterônico e com a produção de ácido hialurônico pela células do *cumulus*, que leva à mucificação e expansão das mesmas, acompanhado do rompimento das junções gap (VAN DEN HOURK & ZHAO, 2005).

Marcantes alterações na síntese de proteínas específicas são observadas no oócito bovino. Durante essa etapa, uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação é envolvido na regulação da retomada da meiose. Durante esse período observa-se a fosforilação do AMPc e aumento dos níveis de cálcio. Durante o pico de LH, que não observa apenas a rápida redução do AMPc, mas também estimula um aumento intracelular de cálcio nas células da granulosa e células do

cumulus, que ativa a fosfolipase C, um derivado do colesterol que rapidamente se transforma em fosfatoinositide e, que por hidrólise, produz o inositol trifostato (IP3). A mobilização de cálcio é precedida pelo influxo de cálcio do ambiente extracelular (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). O pico de LH induz a alta frequência dos sinais de cálcio

Durante a maturação citoplasmática, observa-se um aumento na atividade das proteínas quinases. A proteína denominada de fator de promoção da maturação (MPF) é responsável pelo início da maturação, atuando de forma que assegure que o ciclo celular prossiga de forma correta. (ARRIS, et al., 2000). O MPF é formado por duas subunidades, a ciclina B, subunidade regulatória, e a cdc – 2, subunidade catalítica. (VAN DEN HOURK & ZHAO, 2005). Em oócitos imaturos, o MPF mantém-se com baixa atividade. Na retomada da meiose, torna-se ativo, atingindo atividade máxima em MI. Sua inativação em MII é induzida pela fecundação e é necessária para que ocorra o desbloqueio da meiose e sua conclusão (MEINECKE, 2002). O MPF ativo é capaz de fosforilar as proteínas que formam o envelope nuclear, condensação dos cromossomos e reorganização do citoesqueleto. (VAN DEN HOURK & ZHAO, 2005). Essa ativação é um processo “two-steps”, envolvendo a desfosforilação da treonina 14 e resíduos da tirosina 15. O que desencadeia a ativação do MPF parece ser a concentração de AMPc no complexo *cumulus* – oócito. Uma vez ativo, o MPF desencadeia os eventos observados na maturação nuclear (WEHREND & MEINECKE, 1998).

Várias enzimas são coordenadas de modo a controlar a maquinaria de tradução de sinais extracelulares para o ambiente intracelular, de forma a estimular os efeitos mitogênicos. Um grupo dessas enzimas é proteína quinase ativadora de mitógenos (MAPK) (WEHREND & MEINECKE, 1998). Ela atua na fosforilação de diversos substratos, incluindo fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto (BLENIS, 2004). Pelo fato dessas proteínas serem ativadas por sinais extracelulares, as suas principais isoformas são chamadas de quinase regulada por sinal extracelular (ERK 1 e ERK 2), que são ativadas com a proximidade da VGBD,

em oócito bovino (KUBELKA et al., 2000), sugerindo que a MAPK não é requerida no início da meiose, mas é essencial em eventos pós – VGBD (KANO, 2000).

É bem estabelecido que o Trifosfato de Adenosina (ATP) é necessário para viabilizar diversas funções celulares, incluindo motilidade e regulação da sobrevivência celular. A função do ATP na aquisição de competência do oócito foi analisada em diversas espécies como bovinos (STOJKOVIC et al., 2001) e camundongos (VAN BLERKONM et al., 1995), demonstrando que o nível de ATP pós MIV é maior em oócitos de melhor classificação do que naqueles de classificação inferior.

A concentração de AMPc intraoocitário desempenha um papel importante na manutenção da meiose na fase de diplóteno (THRIPATI et al., 2010), sendo que o reinício da meiose está associado à redução da sua concentração. No decurso da maturação de oócitos, a enzima adenil ciclase (AC), quando ativada transforma o ATP em AMPc que mantém a retenção meiótica, por ativar a proteína quinase (PKA). Existe uma hipótese que a transferência contínua de AMPc das células da granulosa para o oócito via gap junctions mantém a retenção da meiose (CHAUBE, 2002). No entanto recentemente foi reportado que a concentração de AMPc intraoocitário é suficiente para a retenção da meiose (VACARI et al., 2008). A guanosina monofosfato cíclico (GMPc) também atua como um importante sinalizador inibitório para a retenção da meiose (TRIPATHI et al., 2010). O GMPc passa das células da granulosa e do *cumulus* para o oócito via junções gap, onde inibe a hidrólise do AMPc pela fosfodiesterase do tipo 3 (PDE3A). O envolvimento da proteína G estimuladora (Gs) e do receptor de proteína G acoplada (GPRC) da AC, possuem um papel mediador na produção de AMPc intraoocitário (MEHLMANN et al., 2002). Concentrações intracelulares de AMPc têm se mostrado ser o regulador das gap junctions em vários tipos celulares (SHU et al., 2008). Em oócitos bovinos, o AMPc intraoocitário possui um papel fisiológico nas gap junction, mediando a comunicação bidirecional entre oócito e células do *cumulus* (LUCIANO et al., 2004).

Outro fator determinante dos níveis de AMPc intraoocitário, e assim inativando a retenção meiótica é a fosfodiesterase (PDE), responsável pela degradação do AMPc no oócito por hidrólise. O oócito possui a PDE – 3, uma potente enzima que hidrolisa o AMPc (GILCHRIST, 2011). A inibição da PDE – 3 que é expressa especificamente em oócitos, bloqueia completamente a maturação *in vivo* e *in vitro* de oócitos, ao contrário da PDE – 4, que é específica para as células da granulosa, não exercendo efeito sobre o oócito (THOMAS et al., 2003).

3.1.3 Retenção meiótica

Uma possível estratégia para melhorar o resultado da maturação *in vitro* é manter os oócitos meioticamente retidos por um período mais prolongado de tempo ao invés de permitir que os mesmos sofram a quebra da vesícula germinativa (VGBD) logo após serem aspirados do folículo (QUETGLAS, 2007). Esse período de "cultura de pré-maturação" daria ao oócito mais tempo para sofrer alterações citoplasmáticas que poderiam melhorar a sua competência e capacidade de desenvolvimento.

A inibição da retomada da meiose tem sido sugerida como uma estratégia para que os oócitos adquiram um tempo adicional para sofrerem modificações necessárias para aquisição de competência (LONERGAN et al., 2000). Portanto, esse tempo adicional possibilitaria uma melhor sincronização entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática, com o objetivo de maximizar a produção de embriões (LE BEAUX et al., 2003). Sabe-se que *in vivo*, a presença das gonadotrofinas leva inicialmente a um aumento e posteriormente uma diminuição do AMPc intraoocitário e com isso a retomada da meiose, fato este que não ocorre na maturação *in vitro* (RODRIGUEZ & FARIN, 2004). A adição de LH e hormônio folículo estimulante (FSH) em meio de maturação promovem uma melhora na expansão das células do *cumulus*, induzem a retomada da meiose e, portanto facilitam a fecundação.

Estudos têm mostrado que é possível simular o que ocorre *in vivo*, utilizando substâncias químicas e obtendo um aumento considerável na produção de blastocisto. Albu et al. (2010), simularam a maturação fisiológica do oócito, utilizando os inibidores da meiose Forskolin e IBMX em bovinos e em camundongos, e obtiveram uma melhora na taxa de blastocistos com aumento substancial na taxa de implantação. O AMPc pode ter seus níveis elevados pela adição, no meio de maturação, de substâncias como análogos do AMPc, como dibutil AMPc, ativadores da adenilato ciclase, como FSH e forskolin e inibidores da PDE, como inibidores não específicos, o Isobutil – metilxantina (IBMX), o PDE- 3 específico, a cilostamida ou milirone e PDE – 4 específico, o rolipram. (GILCHRIST & THOMPSON, 2007). Resultados positivos têm sido obtidos utilizando em conjunto ativadores da adenil ciclase com inibidores da PDE não específico, de forma a retardar a VGBD ao mesmo tempo em que estende a duração das junções gap do oócito e células do *cumulus* durante a fase da retomada da meiose (ALBUZ et al., 2010).

Forskolin, um estimulador reversível da subunidade catalítica da guanilato ciclase, tem sido utilizado para aumentar o AMPc em oócitos de hamster (RASCOWSKY, 2005), bovinos e camundongos (ALBUZ et al., 2010). Da mesma forma, o Isobutil metilxantina (IBMX), receptor não específico de fosfodiesterases, induziu uma retenção meiótica e promoveu uma maior competência para atingir o estágio de blastocisto (RODRIGUEZ & FARIN, 2004; OLA et al., 2007).

3.1.4 Conclusão

A partir do uso de substâncias químicas, para a suplementação de meios de maturação, que causam efeitos intracitoplasmáticos como a retenção da meiose, é possível obter uma maior competência do oócito, e conseqüentemente aumentar as taxas de blastocistos produzidos *in vitro*. Com este avanço na tecnologia de produção de embriões *in vitro*, torna este método mais rentável ao ponto de vista econômico e científico, alavancando a aplicação da técnica em maior escala por sua

acessibilidade de valor, e também o número de trabalho publicados em pesquisas que dependem de grande quantidade de embriões para serem efetivadas.

4 RELATÓRIO

4.1 Produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos

4.1.1 Introdução

Embriões produzidos *in vitro* são aqueles obtidos pela manipulação de gametas, fora do organismo materno, ou seja, em condições laboratoriais. Atualmente, face a consideráveis avanços científicos, essa tecnologia consiste na combinação de vários processos interdependentes, que vão desde a obtenção de oócitos imaturos (aspirados diretamente dos folículos ovarianos por punção folicular - agulha acoplada a uma sonda transvaginal) à transferência dos embriões para as fêmeas receptoras (barrigas de aluguel), passando pelas etapas de maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos e cultivo *in vitro* dos embriões (EMBRAPA/CENARGEN, 2010).

A PIV é uma biotécnica utilizada alternativamente para acelerar a produção de animais geneticamente superiores, possibilitando a utilização de bezerras pré-púberes, vacas em início de gestação, vacas com subfertilidade adquirida e vacas senis, e impedir através da técnica de ovum pick-up (OPU), o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas, incapazes de reproduzirem de forma natural (GONÇALVES et al., 2002).

A PIV também é uma técnica fundamental para o uso de todas as novas biotécnicas de reprodução animal, pois através do estabelecimento desta, técnicas como a clonagem por transferência nuclear (SCNT), a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e a transgenia podem ser aprimoradas e utilizadas, além de tornar possível a produção de embriões pré-sexados e embriões ou zigotos em

vários estágios de desenvolvimento, para o estudo de transgênese e clonagem. Atualmente, também tem sido utilizada para avaliar o potencial reprodutivo de touros, avaliando com mais precisão a fertilidade do reprodutor. Apesar dos avanços ocorridos nos últimos anos nessa biotécnica, a utilização comercial da PIV ainda está limitada ao seu elevado custo, e vai depender do balanço entre o mérito genético do produto (terneiro) e o custo de sua produção (EMBRAPA/CENARGEN, 2000).

É possível resumir algumas aplicações da PIV que se enquadram a todas as espécies de animais domésticos: obter uma maior quantidade de embriões em menor período de tempo; obter um grande número de embriões para experiências que visam a obtenção de animais transgênicos; estudar alguns mecanismos ainda desconhecidos da maturação oocitária, da capacitação espermática e da fecundação propriamente dita; testar *in vitro* a fertilidade potencial de machos utilizados em programas de melhoramento genético; determinar novos meios e cultivos celulares para incrementar a produção de bons embriões; abrir espaço para trabalhos científicos e iniciação de novos pesquisadores.

4.1.2 Etapas da PIV

A PIV envolve a aspiração folicular, maturação *in vitro*, fecundação *in vitro* e o cultivo de embriões. A Figura 2 representa todas as etapas desenvolvidas durante a PIV.

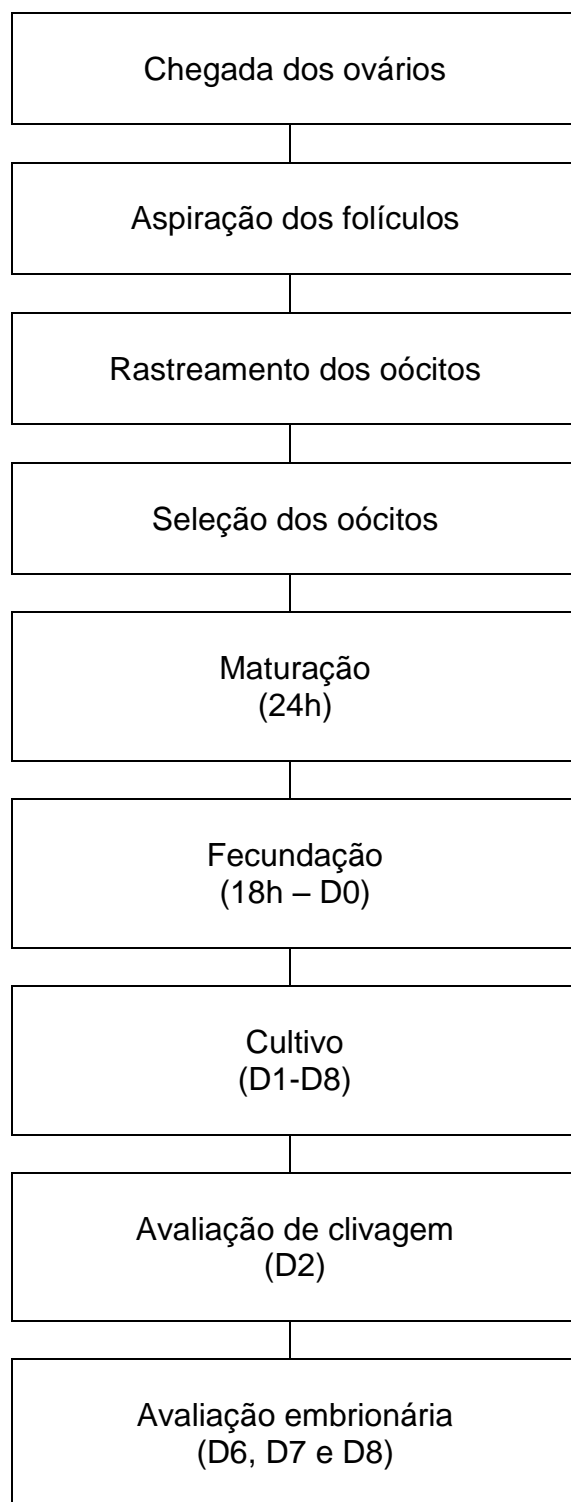


Figura 2. Etapas desenvolvidas durante a produção *in vitro* de embriões bovinos.

4.1.2.1 Aspiração folicular

Os oócitos para PIV podem ser obtidos por diferentes métodos: *in vitro*, através de aspiração folicular de ovários oriundos de vacas abatidas; *in vivo* através da OPU, utilizando uma agulha acoplada a uma sonda transvaginal.

Apesar dos ovários obtidos em abatedouros não serem de matrizes de elevado mérito genético, são uma importante fonte de oócitos para serem utilizados na pesquisa.

No Laboratório de Reprodução Animal do Cenargen os ovários foram obtidos, rotineiramente, de vacas abatidas em frigoríficos da região. Após a coleta, os ovários foram transportados até o LRA em recipiente de vidro estéril, contendo solução salina (0,9%) suplementada com sulfato de estreptomicina e penicilina sódica, uma vez que os oócitos são sensíveis a mudanças de temperatura, o recipiente contendo os ovários foi acondicionado em uma caixa térmica com água a 32-35°C. Essa temperatura foi checada antes, durante e depois do transporte.

Ao chegar no laboratório os ovários foram lavados com solução salina estéril previamente aquecida. Após a solução salina ser trocada, o recipiente foi colocado em um banho-maria para manter a temperatura desejada até o fim da aspiração. Este banho-maria ficava dentro de um fluxo laminar horizontal onde ocorria a aspiração folicular.

A aspiração dos folículos foi realizada com escalpes 18G, utilizando uma bomba a vácuo (10-15mL/min), sendo o líquido depositado em tubos de 15mL (Figura 2), aguardando 10min para sedimentação dos oócitos. Após acabar o tempo de sedimentação os tubos tinham o sobrenadante retirado e centrifugado em outros tubos, para torná-los limpos e serem dispostos em placas de Petri com tamanho de 96x21mm junto com o *pellet* contendo os oócitos.



Figura 3. Aspiração folicular com bomba a vácuo.

4.1.2.2 Rastreamento e seleção de oócitos

Após o *pellet* contendo os oócitos ser colocado na placa de Petri junto com o líquido folicular, o rastreamento foi realizado sobre placas aquecedoras em uma lupa estereomicroscópica, em fluxo laminar horizontal (Figura 3). Os oócitos encontrados foram colocados em placas de Petri de 40x12mm contendo meio de manutenção, soro fetal bovino (SFB) e antibiótico, para posterior seleção.



Figura 4. Fluxo laminar horizontal com lupas estereoscópicas e placas aquecedoras, onde foram realizadas as manipulações no laboratório.

Os oócitos foram selecionados de acordo com a qualidade, avaliando uniformidade do citoplasma e a quantidade e aparência das células do *cumulus*.

Existem diversas categorias para classificação de oócitos, as quais variam segundo os autores e são importantes para fins científicos e controle de qualidade.

Leibfried et al. (1979), descreveram os critérios para a seleção de oócitos, que estão dispostos a seguir:

- a) Grau I: *Cumulus* compacto, contendo mais de três camadas de células. Citoplasma com granulações finas e homogêneas, de coloração marrom, preenchendo o interior da zona pelúcida.
- b) Grau II: *Cumulus* compacto parcialmente presente ou com menos de três camadas celulares rodeando completamente o oócito. Citoplasma com granulações distribuídas heterogeneamente.

- c) Grau III: *Cumulus* expandido. Citoplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida.
- d) Grau IV: Oócito sem *cumulus* (desnudo).

Após a seleção dos oócitos, estes foram colocados em gotas de meio de maturação para lavagem antes de serem colocados nas gotas da placa de maturação previamente preparada e estabilizada.

4.1.2.3 Maturação *in vitro*

A maturação do oócito é essencial no processo de PIV, pois é onde ele adquire capacidade para ser fecundado posteriormente. Portanto, a maturação dos oócitos depende da eficiência do método de coleta e, principalmente, dos meios e métodos de maturação *in vitro* (PALMA et al., 2001).

Quando os oócitos são retirados de folículos terciários e cultivados *in vitro*, a maturação ocorre tanto no núcleo quanto no citoplasma. Somente oócitos com maturação nuclear e citoplasmática podem ser fecundados. A primeira modificação visível do núcleo é a condensação da cromatina e a dissolução da membrana nuclear, processo conhecido como ruptura da vesícula germinativa (PALMA et al., 2001).

A maturação do oócito está ligada a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o gameta feminino apto para ser fecundado e ter desenvolvimento embrionário subsequente. *In vivo*, esse processo tem início com o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) (GONÇALVES et al., 2002).

A maturação é realizada a partir do uso de meio de cultura de tecido, suplementado com soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas em atmosfera com 5% de CO₂ e temperatura de 39°C. Fazem-se gotas de 200µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral, e estabilizadas na estufa por pelo menos duas horas antes de colocar de os oócitos (25-30 por gota).

O SFB é utilizado como fonte protéica. O soro junto com a albumina bovina, é o complemento orgânico muito importante dos meios, levando a uma perfeita expansão do *cumulus* e maturação do oócito.

A função das gonadotrofinas FSH (hormônio folículo estimulante) e LH é assegurar níveis semelhantes aos existentes *in vivo*, proporcionando condições adequadas para uma perfeita fecundação e desenvolvimento embrionário (GONÇALVES et al., 2002).

Após a seleção efetuava-se a transferência dos oócitos da placa contendo o meio de manutenção para a placa contendo o meio de maturação, retornando o mais breve possível para a estufa, a fim de evitar alteração de pH, o que poderia prejudicar a viabilidade dos oócitos.

Depois de 20-24 horas de incubação, os oócitos tornam-se completamente maturados, com expulsão do primeiro corpúsculo polar e estão prontos para a fecundação.

4.1.2.4 Fecundação *in vitro*

A fecundação resume os eventos iniciados pela penetração do espermatozóide através dos diferentes revestimentos celulares e não celulares que rodeiam o oócito e culminam com a formação dos pró-núcleos. É uma reação em cascata, desencadeada pela passagem do espermatozóide pela zona pelúcida, penetração na membrana plasmática e seu alojamento no interior do citoplasma oocitário (PALMA et al., 2001).

Para a realização da fecundação *in vitro* são necessários a separação e a capacitação espermática. Isto é feito através da remoção dos fatores decapacitantes, derivados das vias genitais masculinas e da interação das células espermáticas com os chamados “fatores capacitantes”, que se encontram no trato genital feminino. Para a capacitação, ocorrem modificações bioquímicas e estruturais que levam a eliminação de componentes aderidos à membrana do espermatozóide, modificação da composição lipídica da membrana plasmática,

aumento da permeabilidade aos íons de Ca^{++} , modificação do pH interno e um incremento na permeabilidade e no metabolismo celular. Todas estas modificações levam a reação acrossômica cuja ativação prematura é evitada pelos mesmos fatores que regulam a capacitação (PALMA et al., 2001).

Para capacitação *in vitro*, emprega-se a heparina, a qual desencadeia a capacitação, finalizando a reação acrossômica e permitindo a penetração do espermatozóide através da zona pelúcida (PALMA et al., 2001) e o PHE (Penicilamina, hipotaurina, epinefrina) que tem a finalidade de aumentar a atividade espermática e facilitar a sua penetração, incrementando os índices de fecundação (GONÇALVES et al., 2001). Estes agentes responsáveis por capacitar os espermatozoides são incluídos no meio de fecundação.

A técnica de separação espermática tem a finalidade de remover os espermatozoides mortos, os crioprotetores e recuperar a maioria dos espermatozoides móveis sem produzir alterações espermáticas. Além disso, deve permitir o controle da concentração e volume final da suspensão espermática (GONÇALVES et al., 2001).

A técnica utilizada para a separação dos espermatozoides vivos dos demais componentes do sêmen e dos crioprotetores no LRA do Cenargen foi a técnica do gradiente *Percoll*, no qual utilizava-se um eppendorf com uma solução contendo 90% de *Percoll* ao fundo e 45% de *Percoll* na superfície.

Primeiramente, descongelava-se a palheta de sêmen em banho-maria a 37°C por 30 segundos e vertia-se o conteúdo da palheta em um eppendorf. Do conteúdo deste eppendorf, 5µL foram colocados em uma lâmina para avaliação de motilidade e vigor para saber se a utilização do sêmen era viável. O restante do sêmen foi pipetado e colocado dentro do eppendorf contendo o gradiente de *Percoll*. Este eppendorf foi centrifugado por 5 minutos a 5000x g. O sobrenadante produzido por esta centrifugação foi descartado e o *pellet* foi colocado em um eppendorf contendo uma solução para ser lavado. Mais uma vez o tubo eppendorf foi centrifugado nas mesmas condições. Enquanto a centrifugação ocorria, os oócitos maturados foram transferidos da placa de maturação para a placa contendo as gotas com meio de

fecundação suplementadas com heparina e PHE. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspenso em proporções iguais de meio de fecundação. Novamente 5 μ L do sêmen ressuspenso têm sua motilidade e vigor avaliados. Outros 5 μ L são misturados a 95 μ L de água, e desta mistura são retirados 10 μ L para fazer a contagem de células na câmara de Neubauer. A dose inseminante é calculada a partir da fórmula disposta na Figura 4.

$$\text{Dose inseminante} = \frac{\text{Vol. Gota } \mu\text{L}}{\text{Quantidade que falta para 100\% de motilidade}}$$

Figura 5. Fórmula utilizada para calcular a dose inseminante.

O volume da dose inseminante é colocado nas gotas da placa de fecundação com os oócitos em uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/ml. Espermatozoides e oócitos ficam co-incubados por 18 horas. O dia da fecundação é considerado como o dia 0 (D0).

4.1.2.5 Cultivo *in vitro*

Os meios de cultivo são de extrema importância para o desenvolvimento embrionário, portanto os aspectos básicos que são buscados nestes são: o desenvolvimento de meios de cultivo que atendam as necessidades metabólicas dos embriões durante seu desenvolvimento e que evitem em sua composição as células somáticas, pois estas, após o quarto dia de cultivo, começam a competir com os embriões (PALMA et al., 2001).

Para que se chegasse ao desenvolvimento embrionário dos dias atuais, foi preciso conhecer as necessidades bioquímicas dos embriões, durante seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Foram estudadas as características bioquímicas do meio, as quais variavam com o tempo de cultivo, indicando a existência de uma completa interação entre o metabolismo embrionário e os substratos do meio (PALMA et al., 2001).

A fonte de energia dos embriões durante seu desenvolvimento *in vitro*, se baseia na fosforilação oxidativa, através da oxidação do piruvato e aminoácidos, durante os três primeiros dias do desenvolvimento embrionário e da glicose durante os próximos três a quatro dias. Os aminoácidos (AA) são componentes essenciais utilizados nos meios de cultivo, que também atuam como fonte de energia, reguladores de pH e precursores de proteínas e ácidos nucléicos. Seu uso permitiu o aumento da proporção de embriões viáveis de várias espécies domésticas (muas, ovina e bovina). A água constitui quase 99% do conteúdo do meio de cultivo (PALMA et al., 2001).

Após o período de fecundação, os prováveis zigotos sofriam desnudamento através de sucessivas pipetagens, onde ocorria a remoção parcial das células do *cumulus* e também de espermatozoides aderidos a elas, o que facilitava posteriormente o processo de avaliação dos embriões. Após o desnudamento foram transferidos para gotas de meio de cultivo, baseado em fluido sintético de oviduto (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais.

4.1.2.6 Avaliação de clivagem

A clivagem inicia-se com uma série de divisões mitóticas, por meio das quais o zigoto, que possui uma célula com grande volume, se divide em diversas células nucleadas de menor tamanho, chamadas blastômeros, até a formação do blastocisto (Figura 6).

A avaliação de clivagem é feita no dia 2 (D2). As estruturas são movimentadas e avaliadas se tinham clivado, dividindo os clivados em dois grupos, o grupo com menos de 4 células e o grupo com 4 ou mais células. Após a avaliação, as placas voltavam imediatamente para dentro das estufas, para evitar que o desenvolvimento dos embriões fosse afetado.

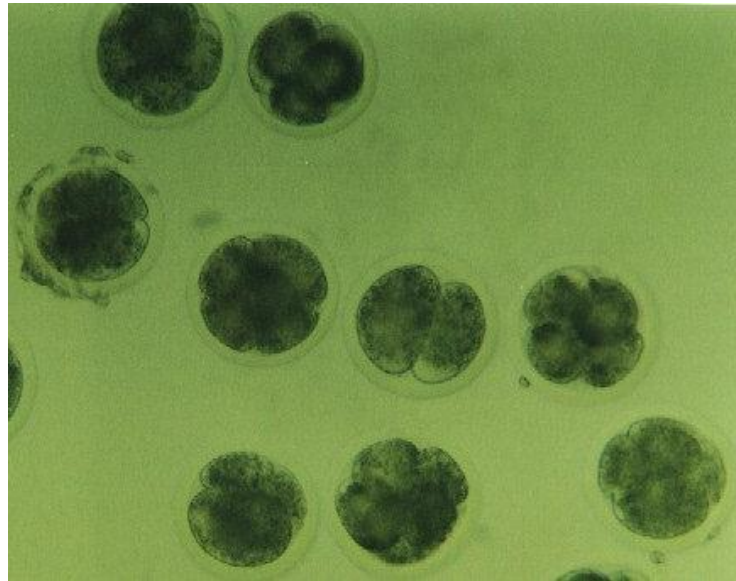


Figura 6. Estruturas clivadas em estágio de duas e quatro células. Fonte: CENTENO, 2005.

4.1.2.7 Avaliação embrionária

Para a avaliação da PIV, utiliza a produção de mórulas e blastocistos, considerando os índices de produção e qualidade embrionária, ressaltando-se que o índice de blastocisto expandido é o parâmetro mais confiável da eficácia de todo o processo de PIV (GONÇALVES et al., 2002).

A avaliação dos embriões é realizada nos dias 6, 7 e 8 pós inseminação (D6, D7 e D8), considerando-se a fecundação o D0.

A classificação dos embriões foi feita conforme o estágio de desenvolvimento, onde os embriões foram divididos em seis categorias:

Mc – Mórula Compacta: os blastômeros estão agregados entre si, formando uma massa compacta e ocupam 60-70% do espaço perivitelino (EPV).

Bi – Blastocisto Inicial: formação da blastocele e ocorre o início da diferenciação entre trofoblasto e botão embrionário. O embrião ocupa 70-80% do EPV.

Bl – Blastocisto: evidente diferenciação entre células do trofoblasto e do botão embrionário; as células do botão embrionário estão compactas, a blastocele é proeminente e o embrião ocupa a totalidade do EPV.

Bx – Blastocisto expandido: o embrião aumenta uma vez e meio o seu diâmetro e a membrana pelúcida diminui em um terço sua espessura.

Bn – Blastocisto em Eclosão: o embrião está iniciando o processo de saída da membrana pelúcida.

Be – Blastocisto Eclodido: o embrião está completamente livre da membrana pelúcida; ainda é nítida a presença da blastocele.

No dia 7 (D7) só foram considerados os blastocistos iniciais (Bi), blastocistos (Bl), blastocistos expandidos (Bx), blastocistos em eclosão (Bn) e blastocistos eclodidos (Be). Visto que, neste dia os embriões deveriam ter alcançado no mínimo, o estágio de blastocisto inicial, a maioria estando no estágio de blastocisto e alguns no estágio de blastocisto expandido. Alguns embriões só alcançariam estes estágios no dia 8 ou 9, sendo estes considerados embriões de baixa qualidade (GALLI et al., 2003).

4.2 Avaliação da maturação nuclear

A avaliação da maturação nuclear foi feita em oócitos divididos em dois grupos, os imaturos (0h) e os maturados (24h de maturação), foi esperado encontrar oócitos com vesícula germinativa (VG) intacta evidenciando o estágio de prófase I, e oócitos no estágio de metáfase II com cromossomos alinhados na placa metafásica (Figura 5).

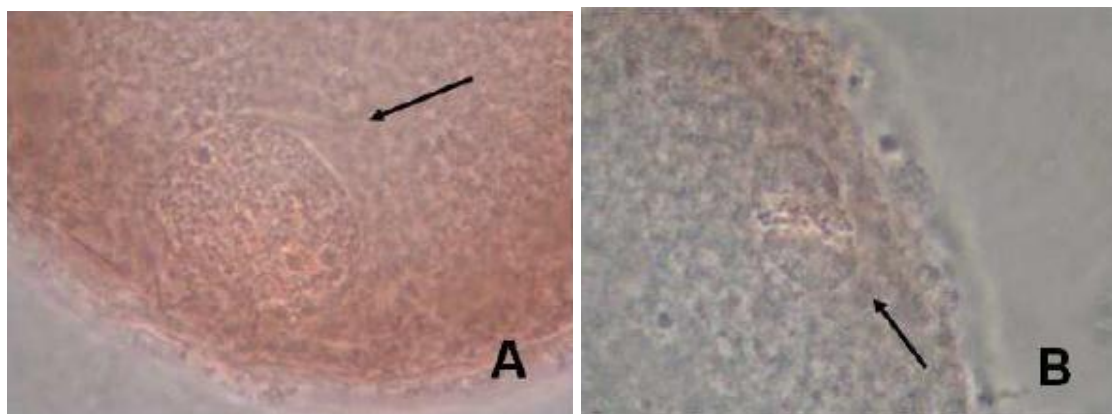


Figura 7. Oócito com vesícula germinativa em prófase I (A); Oócito em metáfase II (B). As setas indicam a cromatina em cada imagem. Fonte: SPRICIGO, 2011.

Para a avaliação da maturação nuclear, os complexos *cumulus* oócitos (CCOs) foram expostos a solução contendo hialuronidase durante 5 minutos, e logo após sofriam desnudamento total, removendo as células do *cumulus* através de sucessivas pipetagens. Os oócitos desnudos foram fixados em uma solução (3:1) de álcool etílico e ácido acético, onde permaneciam por no mínimo 48 horas. Após o período de fixação, os oócitos foram colocados em lâminas e sobrepostos por lamínulas contendo vaselina sólida em duas arestas, para não esmagar os oócitos e ao mesmo tempo fazer com que o corante lacmóide em solução de ácido acético a 45% passasse por entre a lâmina e a lamínula e fosse removido por lavagens com a mesma solução fixadora. A avaliação morfológica dos oócitos corados foi realizada em microscópio de contraste de fase.

4.3 Coloração de embriões

Quando os embriões em D8 chegavam no estágio de Bx, eram selecionados e colocados em solução contendo 990µL de PBS e 10µL de corante Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, EUA) durante 5 minutos, protegidos da luz, já que o corante é fotossensível. O corante Hoechst 33342 é um fluorocromo que se liga não covalentemente ao DNA celular, preferencialmente a regiões adenina-timina (A-T) e emite uma fluorescência azul quando excitado por luz ultra-violeta. Após o tempo de contato dos embriões com a solução, estes foram colocados em lâminas e sobrepostos por lamínulas. A visualização foi feita em microscópio de epifluorescência em filtro UV-2A com comprimento de onda entre 330-380nm (Figura 6). Foi feita contagem dos blastômeros para se ter um controle de qualidade dos embriões produzidos.

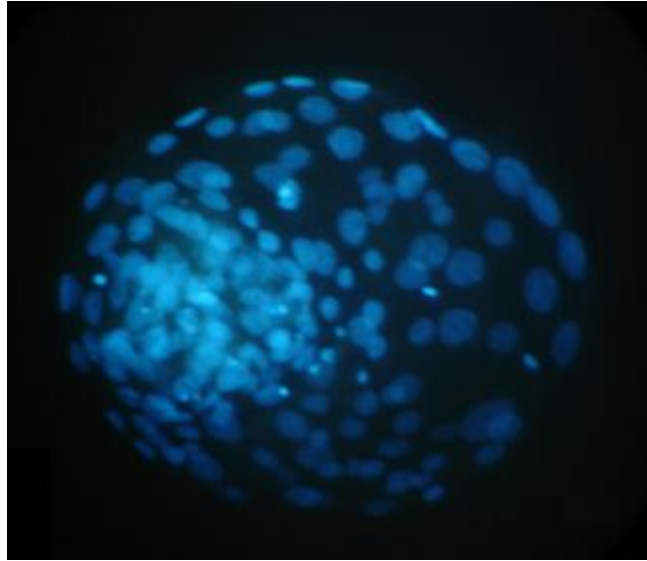


Figura 8. Blastocisto corado com Hoechst 33342, evidenciando os blastômeros em cor azul.

Fonte: BORGES, 2008

4.4 Vitriificação de oócitos

4.4.1 Introdução

A criopreservação de oócitos é capaz de trazer inúmeros benefícios para o uso das técnicas de reprodução assistida tanto em animais como em humanos. Na PIV, a possibilidade de criopreservação dessas estruturas otimizaria a logística, por facilitar o transporte a longas distâncias e maximizar a disponibilidade de receptoras. Essa técnica é também uma ferramenta importante para formação de bancos de material genético e comercialização de material biológico, além de ser indispensável para a conservação de raças e espécies ameaçadas de extinção. Além disso, com a evolução das biotecnologias, estes oócitos criopreservados poderiam também ser utilizados para produção de animais transgênicos e em programas de clonagem, por transferência nuclear (SPRICIGO, 2011).

Em relação aos humanos, o desenvolvimento de um método eficaz de criopreservação ajudaria mulheres com problemas oncológicos, pois uma vez submetidas a processos quimio ou radioterápicos, ficam sujeitas a perda prematura da função ovariana (BOISO et al., 2002).

Porém a criopreservação de oócitos é ainda uma técnica pouco eficiente, considerando que a capacidade de desenvolvimento embrionário posterior é insatisfatória na maioria dos mamíferos. Essa alta sensibilidade à criopreservação pode ser explicada por suas características morfológicas e funcionais peculiares, como o tamanho celular, volume de água no citoplasma, organização do citoesqueleto, distribuição de organelas e estágio da meiose (FUKU et al., 1995; HOCHI et al., 1998; DIEZ et al., 2005; ADONA et al., 2008).

Kuwayama et al. (2005) desenvolveram o método de *cryotop*, em que o volume final de solução de vitrificação não ultrapassa 0,1µL. Esse método, até o presente, apresenta os melhores resultados para a criopreservação de oócitos em humanos e em várias espécies de animais domésticos (SPRICIGO, 2011).

4.4.2 Metodologia

Para a vitrificação foram utilizadas as soluções e o protocolo de acordo com a metodologia do *cryotop* desenvolvido por Kuwayama et al. (2005).

Para vitrificação os CCOs foram submetidos a 3 banhos em solução de equilíbrio, constituída de solução de manutenção acrescida de 7,5% de etileno glicol e 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), durante 3 minutos cada banho. Após o equilíbrio os oócitos foram transferidos para a solução de vitrificação, composta por solução de manutenção suplementada com 15% de etileno glicol, 15% de DMSO e 0,5 molar de sacarose, nesta solução os oócitos passavam por 4 banhos de 15 segundos cada.

Os oócitos foram então colocados em hastes de vitrificação com auxílio de micro pipeta de vidro. Imediatamente após a deposição dos oócitos nas hastes, o excesso de solução foi retirado deixando somente uma fina camada sobre os oócitos. Por fim, a haste foi submergida verticalmente no nitrogênio líquido.

4.5 Clonagem por transferência nuclear de célula somática

4.5.1 Introdução

O recente progresso na clonagem animal por transferência nuclear (TN) possibilitou a produção de animais transgênicos utilizando linhagens de células doadoras de núcleo modificadas geneticamente. A possibilidade de manipulação genética, o estudo da expressão gênica e a adequada seleção da célula doadora de núcleo não somente podem garantir a presença da construção gênica em toda a prole, como também podem evitar a produção de animais portadores de modificações indesejáveis resultantes da inserção aleatória do inserto em regiões codificantes do genoma (BRESSAN et al., 2008)

4.5.2 Metodologia

A manipulação da clonagem começava após 19 horas de maturação dos oócitos. Estes foram colocados em solução contendo hialuronidase durante 5 minutos, então foram transferidos para gotas contendo meio de manutenção para serem desnudados. Após o desnudamento, os oócitos foram transferidos para placas contendo solução com citocalasina, e ficavam nesta placa durante 30 minutos. Durante os 30 minutos dos oócitos na citocalasina, os fibroblastos foram removidos da garrafa de cultivo através do uso de tripsina e armazenados em tubos com soro albumina bovina, permanecendo no gelo até o uso.

Já no micromanipulador, em meio de manutenção, os oócitos sofriam a retirada do corpúsculo polar e de uma parte do citoplasma na periferia do corpúsculo (onde a cromatina geralmente se encontra). Em seguida foi injetado um fibroblasto no oócito, fazendo com que ele ficasse o mais próximo possível do citoplasma do oócito.

Após todos os oócitos passarem pela micromanipulação, foram colocados um de cada vez entre eletrodos em solução de manitol e expostos a dois pulsos de 2.23kV para ocorrer a eletrofusão. Os oócitos foram colocados novamente em gotas de meio de manutenção durante 30 minutos, para posteriormente avaliar em lupa estereoscópica se houve a fusão, caso necessário era feita uma nova fusão. Depois de fusionados, os oócitos ficavam 5 minutos em gotas de ionomicina na estufa, e logo após para gotas com 6-DMAP (6-dimetilaminopurina) por 4 horas. Por fim, foram colocados em placas com meio de cultivo (SOF).

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos, à partir das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular estão relacionadas na Tabela 1, e os resultados das avaliações de clivagem e de embriões estão dispostos na Tabela 2.

Atividade	Número de vezes realizada
Aspiração folicular e rastreamento	21
FIV	5
Avaliação de clivagem	9
Avaliação embrionária	9
Coloração de oócitos	13
Coloração de embriões	5
Acompanhamento de vitrificação de oócitos	1
Acompanhamento de clonagem	1
Journal Club	8

Tabela 1. Atividades realizadas durante o estágio curricular.

D2		D6				D7					D8					Total	%
N	C	Mc	Bi	BI	Bx	Bi	BI	Bx	Bn	Be	Bi	BI	Bx	Bn	Be		
301	168	73	14	11	2	15	39	27	-	-	4	18	37	8	14	81	27

Tabela 2. Taxas das avaliações de clivagem e de embriões. N: número de oócitos; C: clivados.

6 CONCLUSÃO

O estágio no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Cenargen, apresentou inúmeras ferramentas para o aprendizado prático para qualificação e capacitação profissional, além de fornecer o aprimoramento de conhecimentos científicos. O conhecimento técnico do sistema de produção de embriões junto às pesquisas realizadas no laboratório foram as principais ferramentas utilizadas durante o estágio para conhecimento da atuação de um Bacharel em Biotecnologia frente a uma empresa de pesquisa. A especialização da produção de embriões, através da incorporação de tecnologias é capaz de não só produzir animais para pesquisa e fins comerciais envolvendo a transgenia, mas também se tornar o novo rumo da pecuária nacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P. R.; PIRES, P. R.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R.; LEAL, C. L. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**. v. 108, p. 49-65, 2008.

ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G. GILCHRIST, R. B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, Vol.00, No. 0 pp. 1–13, 2010.

BAUTISTA, J. N. & KANAGAWA, H. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. *J Vet. Res.* 45, p. 183-191. Citado por CABODEVILA, J. & TERUEL, M. Criopreservação de Embriones Bovinos, p. 149-167. In: PALMA, G. **Biotecnologia de la Reproducción**, Argentina, 1Ed. INTA Editora, 2001. 701 p.

BOISO, I.; MARTI, M.; SANTALO, J.; PONSÁ, M.; BARRI, P. N.; VEIGA, A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. **Human Reproduction**. v. 17, p. 1885-91, 2002.

BORGES, J. C. Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro*. Orientador: Paulo Henrique Franceschini. Jaboticabal: UNESP/FCAV, 2008. Defesa de tese. (Doutorado em Medicina Veterinária).

BRESSAN, F. F.; MIRANDA, M. S.; DE BEM, T. H. C.; PEREIRA, F. T. V.; BINELLI, M.; MEIRELLES, F. V. Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.240-250, out./dez. 2008.

CENTENO, A. C. Biotecnologias da Reprodução Animal. Trabalho apresentado a Universidade Federal de Pelotas para obtenção do título de Médica Veterinária, 2005.

COHEN, P. E; POLLARD, J. W. Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals. **BioEssays**, vol.23, p. 996-1006, 2001.

DIEZ, C.; DUQUE, P.; GOMEZ, E.; HIDALGO, C. O.; TAMARGO, C.; RODRIGUEZ, A.; FERNANDEZ, L.; DE LA VARGA, S.; FERNANDEZ, A.; FACAL, N.; CARBAJO, M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. **Theriogenology**. v. 64, p. 317-33, 2005.

EMBRAPA/CENARGEN, 2000. Artigos Embrapa. **Fecundação *in vitro* para o melhoramento animal**. Publicado em 19 jun. 2000. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br>>. Acesso em 20 de julho 2012.

EMBRAPA/CENARGEN, 2010. Tecnologias Embrapa. **Produção de embriões**. Publicado em 05 de maio de 2010. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/_tt/tt04_05embrioes.html>. Acesso em 20 de julho de 2012.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Maturação citoplasmática de ovócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, nº 3, p. 172-181, jul/set.,2008.

FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B. R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**. v. 32, p. 139-56, 1995.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. **Bovine embryo technologies**. *Theriogenology*, v.59. p.599-616. 2003.

GILCHRIST, R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of a new approaches to *in vitro* maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p.23-21, 2011.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v. 67, p.6-15, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de Embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGEUIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda. p. 195-226, 2002.

GREGG, K.; RIDDELL, K. P.; CHEN, S. H.; GALIK, P. K.; XIANG, T.; GUERRA, T.; MARLEY, M. S.; POLEJAEVA, I.; GIVENS, M. D. Risk and prevention of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) transmission through embryo production via somatic cell nuclear transfer (SCNT) using oocytes from persistently infected donors. **Theriogenology**, v. 74, p. 1-10, 2010.

HOCHI, S.; ITO, K.; HIRABAYASHI, M.; UEDA, M.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 49, p. 787-96, 1998.

ILLMENSEE, K.; LEVANDUSKI, M.; ZAVOS, P. M. Evaluation of the embryonic preimplantation potential of human adult somatic cells via an embryo interspecies bioassay using bovine oocytes. **Fertility and Sterility**. v. 85, p. 1248-1260, 2006.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; KATO, O.; LEIBO, S. P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**. v. 11, p. 300-8, 2005.

LE BEAUX, G.; RICHARD, F.J.; SIRARD, M. A. Effect of cycloheximidine, 6- DMAP, riscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. **Theriogenology**, vol.60, p. 1049-1058, 2003.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. Journal of Animal Science, v.48, p. 76-86, 1979. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGEUIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda. p. 195-226, 2002.

LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. Bovine Oocyte and Embryo Development Following Meiotic Inhibition With Butyrolactone I. **Molecular reproduction and development** v.57, p. 204-209, 2000.

OLA, S. I.; WANG, Q.; AI, J.YIN, S.; LIANG, C.; CHEN, D.; SUN, Q. Meiotic Competence and Acetylation Pattern of UV Light Classified Mouse Antral Oocytes After Meiotic Arrest With Isobutylmethylxanthine. **Molecular reproduction and development** 74:591–599 2007.

PALMA, G. Producción in vitro de embriones. In: PALMA, G. **Biotecnología de la Reproducción**, Argentina, 1Ed. INTA Editora, 2001. 701p.

QUETGLAS, M. D. Efeito do bloqueio meiótico na expressão, atividade e distribuição do fator promotor da meiose (MPF) e da proteína cinase ativada por mitose (MAPK) em oócitos bovinos. Tese apresentada a Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doctor Scientiae, 2007.

RACOWSKY, C. Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of hamster oocyte-cumulus complexes. **Journal of Experimental Zoology**, Volume 234, Issue 1, April 2005.

RODRIGUEZ, F. K.; FARIN, E. C. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p. 55-67, 2004.

SPRICIGO, J. F. W. Vitricação de ovócitos bovinos em diferentes estágios da meiose pelo método de cryotop: avaliação de danos morfológicos, funcionais e moleculares. Orientadora: Margot Alves Nunes Dode. Brasília: UnB/FAV, 2011. Dissertação. (Mestrado em Ciências Animais).

TRIPATHI, A.; PREM KUMAR, K.V.; CHAUBE, S. K. Meiotic Cell Cycle Arrest in Mammalian Oocytes. **J. Cell. Physiol.** 223: 592–600, 2010.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

WEHREND, A.; MEINECKE, B. The Meiotic Cell Cycle in Oocytes of Domestic Animals. **Reprod Dom.** Vol.33, p. 289-295, 1998.