

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



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Biotecnologias na produção *in vitro* de embriões bovinos**

**Júlia Damé Fonseca Paschoal**

**Pelotas, 2016**

**JÚLIA DAMÉ FONSECA PASCHOAL**

**Biotechnologias na produção *in vitro* de embriões bovinos**

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: Tiago Veiras Collares

Pelotas, 2016

**Júlia Damé Fonseca Paschoal**

**Bioteecnologias na produção *in vitro* de embriões bovinos**

**Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.**

**Data da Defesa: 09/12/2016.**

**Banca examinadora:**

.....

....

**Prof. Dr. Tiago Veiras Collares (Orientador)**  
**Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas**

.....

...

**Msc. Mariana Härter Remião**  
**Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas**

.....

...

**Msc. Caroline Gomes Lucas**  
**Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas**

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas Catalogação na  
Publicação

P279b Paschoal, Júlia Damé Fonseca

Biotecnologias na produção in vitro de embriões bovinos/  
Júlia Damé Fonseca Paschoal; Tiago Veiras Collares,  
orientador. — Pelotas, 2016.

70 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em  
Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico,  
Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Biotécnicas. 2. Embriões. 3. Reprodução. 4. In vitro. I.  
Collares, Tiago Veiras, orient. II. Título.

CDD : 591.15

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

## Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Maria Denise e Benito; meu irmão, Murilo; meus avós, Júlio, Maria do Horto, José Antônio (*in memoriam*) e Aidê; e aos demais familiares pelo amor, carinho, confiança e paciência incondicional em todas as situações. Além do mais, por tornarem meu estudo em Pelotas possível, bem como a realização do estágio final em São Paulo; e acima de tudo, por sempre me incentivarem e apoiarem a seguir em frente na busca dos meus sonhos e desejos.

Ao meu orientador Tiago Collares, pelo exemplo e pela oportunidade de fazer parte do Grupo de Pesquisa em Oncologia, por ter acreditado e confiado em mim, por seus ensinamentos e pela amizade. Aos colegas e amigos do GPO, pela amizade e colaboração construídos no convívio diário; e pela oportunidade de acompanhar os experimentos dos pós-graduandos, Mariana Remião, Caroline Lucas, Arthur Silva e da Pós Doc. Eliza Komninou, contribuindo muito para o meu crescimento científico e pessoal. A todos os demais professores e funcionários do Curso de Biotecnologia, por todo conhecimento passado e por me proporcionarem uma graduação de qualidade, muito obrigada.

À Andrea Basso e Tiago Collares por darem a oportunidade de realizar estágio final na In Vitro Brasil, tendo a chance de conhecer de perto a realidade de uma empresa de Produção *in vitro* de embriões, bem como ter uma visão mais ampla da complexidade e importância de todo o processo e aprimorar minhas técnicas. Além disso, gostaria de agradecer aos amigos que fiz durante o período de estágio, os quais foram muito importantes: Mayra Alves, Tamie Guibu, Bruna Prado, Caroline Franco, João Carlos Jr e Rodolfo Mingoti. Obrigada pelos momentos de descontração, aprendizado e conselhos.

Aos colegas e amigos da 6ª turma de Biotecnologia: Natália Segatto, Victória Trindade, Raquel Neves, Larissa Daneluz, Eduarda Centeno, Natália Bona, Rodrigo Pinho, Rafael Morales, Cleomar Silva e Pedro Cruzeiro; os quais estiveram comigo desde o início, dividindo as expectativas, anseios, dias e noites de estudos, felicidades e momentos de descontração. Também aos novos colegas que chegaram com o tempo e que hoje fazem parte da nossa turma. Obrigada pela amizade e companheirismo, sem vocês a graduação não teria sido a mesma.

As minhas amigas de Encruzilhada do Sul: Amanda Lopes, Laura Filoda, Miriam Luz e Claudia Filoda; que mesmo com a distância e cada uma seguindo seu

rumo em busca dos objetivos, nunca deixaram de estar presentes em todos os momentos. Por mais que tenhamos passado esse tempo longe, o reencontro sempre foi prazeroso. As amigas de Pelotas: Vitória Dias, Gabriela Luz, e Andressa Maffi, as quais também são fundamentais para mim e estiveram sempre ao meu lado, me incentivando como se fossem minha família. Ao Pedro Rassier pela amizade construída desde a infância, consolidada durante o Ensino Médio, mantida e fortificada ainda mais no período de Universidade. Muito obrigada por todo o incentivo, amizade, diversão e amor.

À FAPERGS pela bolsa de estudos.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma colaboraram e fizeram parte da minha graduação e que, com certeza, foram fundamentais para a realização desta etapa.

## Resumo

PASCHOAL, Júlia Damé Fonseca. **Bioteχνologias na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2016. 70f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma ferramenta biotecnológica de grande interesse econômico. O Brasil detém posição de destaque internacional na PIVE, sendo essa prática uma importante atividade de desenvolvimento econômico do país. Através da maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), a PIVE tem capacidade de proporcionar o aumento da produtividade, através do ganho genético em curto espaço de tempo. Além dos benefícios econômicos, é capaz de auxiliar na recuperação de espécies em riscos de extinção, elucidar aspectos fisiológicos da reprodução e promover bem-estar e melhora da saúde humana e animal. Associada a outras biotécnicas em ascendência, como a transgenia e a clonagem, a produção *in vitro* de embriões pode: produzir animais transgênicos para xenotransplantes e para o entendimento da causa e da progressão de doenças, produzir proteínas de interesse farmacêutico; e produzir células tronco embrionárias para fins terapêuticos. Os mecanismos envolvidos nos processos de MIV, FIV e CIV, já vêm sendo estudados há muitos anos; no entanto, essa técnica ainda possui baixa eficiência, devido à dificuldade de mimetizar todos os eventos que ocorrem *in vivo*, sendo a produção média de blastocistos entre 30-35%. Nesse aspecto, esse é um importante e emergente campo de estudo que requer o desenvolvimento de novos produtos e processos, sendo um excelente ramo para os profissionais de biotecnologia reprodutiva.

Palavras Chave: Biotécnicas; Reprodução; Embriões; *In vitro*; Clonagem; Transgênese.

## Abstract

PASCHOAL, Júlia Damé Fonseca. **Biotechnologies in the in vitro production of bovine embryos**. 2016. 70f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

The *in vitro* production of bovine embryos (IVEP) is a biotechnological tool of high economic interest. Brazil holds an outstanding international position in PIVE, being this practice an important economic development activity of the country. Through *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC), the IVEP has the capacity to increase productivity through genetic gain in a short period of time. Besides the economic benefits, it is able to assist in the recovery of species at extinction risks, to elucidate the physiological aspects of reproduction, to promote well-being and improve human and animal health. Associated with others biotechnology tools, such as transgenics and cloning, the *in vitro* production of embryos can: produce transgenic animals for xenotransplantation and for understanding the cause and progression of diseases, produce proteins of pharmaceutical interest and embryonic stem cells for therapy purposes. The mechanisms involved in the IVM, IVF and IVC processes have been studied for many years; However, this technique still has low efficiency, due to the difficulty of mimicking all the events that occur *in vivo*, being blastocyst production between 30-35%. In this regard, this is an important and emerging area of study, development and innovation for reproductive biotechnology professionals.

Keywords: Biotechniques; Reproduction; Embryo; *In vitro*; Cloning; Transgenesis.



## Lista de Figuras

- Figura 1: Representação da estrutura básica de um oócito.**Erro! Indicador não definido.**1
- Figura 2: Representação anatômica de um espermatozoide.**Erro! Indicador não definido.**6
- Figura 3: Etapas da fecundação.....29
- Figura 4: Representação da ICSI.....**Erro! Indicador não definido.**7

## Lista de Abreviaturas e Siglas

Ang II	Angiotensina II
AREG	Anfirregulina
ATP	Adenosina Trifosfato
BCL2	Células B de Linfoma 2
BMP-15	Proteína Morfogênica Óssea 15
BTC	Betacelulina
cAMP	Monofosfato Cíclico de Adenosina
CDC2	Proteína Quinase de Controle do Ciclo Celular
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CP	Corpúsculo Polar
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CAS	Proteína Associada a CRISPR
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNases	Desoxirribonuclease
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EREG	Epirregulina
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GDF-9	Fator de Diferenciação do Crescimento

HAS2	Hialuronidase Sintase 2
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinoetanossulfônico
ICSI	Injeção Intracitoplasmática
IGF1R	Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1
IGF2R	Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 2
IGF-I	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1
LH	Hormônio Luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MPF	Fator Intracelular Promotor da Fase M
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OCT-4	Octâmero Ligado ao Fator de Crescimento 4
OPU	<i>Ovum Pick-up</i>
P32CDC2	Proteína quinase
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PTGS2	Gene codificante da Prostaglandina Endoperoxidase sintase 2
PTX3	Pentraxina 3
RNA	Ácido Ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	<i>Synthetic Oviductal Fluid</i>
SOX2	Região Determinante do Sexo - Y

SP-TALP	<i>TL-Sperm/Sperm-Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate</i>
TALP	<i>Tyrode-albuminalactato-piruvato</i>
TE	Transferência de Embriões
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
TNFAIP6	Proteína 6 induzida pelo fator de necrose tumoral alfa
ZP	Zona Pelúcida
ZP3	<i>Zona pellucida glycoprotein 3</i>

## Lista de Símbolos

%	Porcentagem
R\$	Unidade monetária
°C	Graus Celsius
mm	Milímetro

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	14
2. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE) .....	17
3. Contexto Histórico .....	18
4. Maturação <i>in vitro</i> (MIV) de oócitos.....	20
5. Técnicas de fecundação <i>in vitro</i> de oócitos.....	26
5.1 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV) .....	26
5.2 Injeção Intracitoplasmática (ICSI).....	31
5.3 Transgênese Animal .....	34
5.3.1.1 Microinjeção de DNA .....	35
5.3.1.2. Infecção viral.....	37
5.3.1.2.1. Infecção por retrovírus .....	37
5.3.1.2.2. Infecção por lentivírus .....	38
5.3.1.3 Transferência gênica em células tronco embrionárias.....	38
5.3.1.4 Transferência gênica mediada por espermatozoides (SMGT) ..	39
5.3.1.5 Eletroporação .....	40
5.3.1.6 Sistema CRISPR / Cas.....	41
5.4 Clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS).....	42
6 Cultivo <i>in vitro</i> dos zigotos (CIV) .....	46
7 Considerações finais .....	51
Referências .....	52

## 1. Introdução

A partir dos avanços científico-tecnológicos alcançados nos últimos anos, a Produção *in vitro* de Embriões (PIVE) tem expandido consideravelmente. Este crescimento expressivo tem sido relatado principalmente nos últimos 15 anos na espécie bovina, chegando a marca de 42% de embriões produzidos por FIV do total de embriões produzidos em 2013; sendo desses, 73% produzidos na América do Sul e 22% na América do Norte.

A possibilidade de utilizar sêmen sexado, o qual permite uma concepção de 90% de prole do sexo desejado em um curto intervalo de tempo entre gestações, permitindo rápida reprodução de alta genética, dentre outros fatores, leva a uma maior utilização da FIV em relação a Transferência de Embriões (TE) (BLONDIN, 2015). A TE consiste na transferência de embrião de uma doadora selecionada para uma receptora que seguirá a gestação (MACHATY; PEIPPO; PETER, 2012). Atualmente, na maioria das vezes, é realizada através da superovulação de doadoras de oócitos, seguida por inseminação artificial e após, coleta e transferência não cirúrgica dos embriões para receptoras (BLONDIN, 2015; MACHATY; PEIPPO; PETER, 2012).

A bovinocultura e a PIVE são destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. Em 2005 e 2006 o número de embriões produzidos no país *in vitro* excedeu os produzidos *in vivo* nessa espécie (FIGUEIREDO; GONÇALVES; VISINTIN, 2008; MAPA, 2016). O Brasil detém o segundo maior rebanho bovino do mundo, com 212,3 milhões de cabeças em 2014. Em 2004 obteve liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada em todo o mundo, vendida em mais de 180 países. O rebanho bovino brasileiro permite progresso em dois segmentos lucrativos: carne e leite, ambos totalizam o valor bruto de R\$ 67 bilhões (MAPA, 2016, 201-). Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2016), a produção total de carnes em 2015/2016 está estimada em 26,3 milhões de toneladas. A projeção para o final da próxima década é produzir 34,1 milhões de toneladas de carne de frango, bovina e suína. Já sobre a produção de leite, as taxas chegam a 34,2 bilhões de litros em 2016.

Quanto a PIVE e a TE, no ano de 2013 foi comunicada a produção de 416.970 embriões bovinos no Brasil. O primeiro ciclo da indústria de embriões de 2000 a 2006,

foi essencialmente relacionado ao mercado de raças zebuínas de corte, ao passo que o segundo ciclo, iniciado em 2007, marcou-se pela expansão do uso da FIV em raças leiteiras. (VIANA; FIGUEIREDO, 2015). Recentes estudos desenvolveram técnicas que auxiliam na geração de estruturas mais criotolerantes que os métodos antigos, abrindo fronteiras para exportação de embriões criopreservados produzidos a partir da FIV (BLONDIN, 2015).

A otimização da técnica de PIVE objetiva também a produção de embriões de boa qualidade e em maior número, resultando na diminuição do custo por embrião produzido e permitindo maior difusão da técnica (FIGUEIREDO; GONÇALVES; VISINTIN, 2008). A utilização de ferramentas de genômica como as técnicas de sequenciamento de DNA de nova geração combinadas com a PCR (Reação em cadeia de polimerase) em tempo real, possibilitam a identificação de genes candidatos e seus níveis de expressão (KROPP, et al., 2014). Dessa forma, é possível identificar, através da variação dos níveis de expressão dos genes, animais geneticamente superiores, a seleção dos melhores embriões para transferência, a fertilidade tanto feminina quanto masculina dos animais, auxiliando no aperfeiçoamento da produção de embriões *in vitro* (BLONDIN, 2015; KROPP, et al., 2014).

Adicionalmente, quando obtém-se oócitos para realização da FIV é possível a execução de aspirações mais frequentes em vacas doadoras de oócitos superovuladas (a cada 15 dias, normalmente) do que a técnica de TE, a qual só é possível de ser realizada em um período de 40 a 60 dias. Dessa forma, o ganho da geração de um número maior de embriões em determinado intervalo de tempo se torna consideravelmente vantajoso ao se utilizar a FIV (BLONDIN, 2015).

Com o constante aumento da população mundial, a demanda por alimentos e recursos também cresce continuamente. Atualmente mais de 50% da população mundial é malnutrida, apresentando sobrepeso ou subpeso. Assim, um dos maiores desafios da segurança alimentar é que todas as pessoas, em todos os momentos, possuam acesso físico, econômico e social suficiente à alimentação nutritiva e segura, atendendo suas demandas nutricionais e preferências, para uma vida ativa e saudável. No entanto, a demanda por alimentos deve aumentar mais do que a oferta, intensificando a pressão para a conversão de terras em plantações e pastagens para o setor agropecuário. Dessa forma, mudanças nesse sentido se fazem necessárias mundialmente, estimulando a pesquisa colaborativa e o desenvolvimento da pecuária mais produtiva afim de combater a escassez de alimentos (WEBB; BURATINI, 2016).



No entanto, mesmo passadas três décadas do nascimento do primeiro bezerro concebido a partir de FIV, a taxa de blastocistos obtidos permanece aquém do esperado, possuindo variação entre 20-50% (FIGUEIREDO; GONÇALVES; VISINTIN, 2008). Além da baixa eficiência da técnica, os embriões produzidos possuem qualidade inferior aos gerados *in vivo*, essa inferioridade está atribuída a diversos fatores ligados aos animais e também as condições de cultivo utilizadas na PIVE incluindo, composição do meio, pH, tensão de oxigênio, temperatura entre condições *in vitro* e *in vivo*. Tais diferenças que ocorrem no ambiente criam condições de cultura de embriões inapropriadas, induzindo o estresse oxidativo através do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (AMI et al., 2014). Já foi relatado que estresse por calor é prejudicial para oócitos e embriões bovinos, principalmente em vacas leiteiras, pois ocasiona alterações na produção e liberação dos hormônios que regulam o ciclo estral, diminuição da atividade de antioxidantes, aumento da produção de radicais livres, induzindo a apoptose e conseqüentemente uma diminuição da sobrevivência embrionária (RENSIS; SCARAMUZZI, 2003). Outros fatores importantes são transcritos maternos de fatores de transcrição que são passados ao oócito e que são responsáveis pela ativação do genoma embrionário, o qual tem um papel importante no desenvolvimento embrionário, assim como a taxa de desenvolvimento está ligada a qualidade dos oócitos (CAMARGO et al., 2006; VIGNEAULT, 2004).

Assim, os desafios impostos referentes à saúde reprodutiva humana e animal, a conservação de animais em risco de extinção, a demanda de alimentação, a maior produção por animal, dentre outros fatores; fomentam às pesquisas que almejam evolução constante das técnicas envolvidas na PIVE, buscando beneficiar a comunidade, tanto agrícola quanto geral, com novas tecnologias que assegurem a sustentabilidade da pecuária de acordo com as demandas globais (BAVISTER, 2002; BLONDIN, 2015).

Tendo em vista a grande importância da PIVE tanto no ramo comercial quanto em pesquisas, bem como os desafios quanto sua eficiência o presente trabalho visa apresentar as principais etapas e mostrar um panorama dos mecanismos envolvidos durante a produção *in vitro* de embriões bovinos.

## 2. Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A utilização de biotécnicas da reprodução empregadas a bovinos tem se expandido nos últimos anos. O principal propósito desta técnica é otimizar a reprodução de animais geneticamente superiores, afim de uma maior produtividade. A PIVE é uma das biotécnicas da reprodução com grande expansão e potencial de aplicação comercial. As etapas da PIVE são a maturação *in vitro* de oócitos (MIV), a fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) (BLONDIN, 2015; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

As aplicações da PIVE vão além da propagação rápida de alta genética (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008); A PIVE pode também ser empregada para ampliar o potencial reprodutivo, elucidar funções fisiológicas e auxiliar o entendimento e o aperfeiçoamento da saúde, da reprodução e da qualidade de vida do homem, principalmente aos casos de infertilizados masculina (FABER et al., 2003, RUFINO, 2006). Ainda, auxilia no entendimento dos eventos relacionados à maturação, à fecundação de oócitos, à capacitação espermática, ao desenvolvimento embrionário pré-implantacional, dentre outros eventos relacionados à embriologia (FIGUEIREDO; GONÇALVES; VISINTIN, 2008). Adicionalmente, esta técnica pode ser aplicada afim de formar bancos de germoplasma animal; preservar espécies ameaçadas de extinção, produzir órgãos humanizados, produzir animais resistentes a doenças através de técnicas de transgenia, aumentar a produção de alimentos e produtos de origem animal; e diminuir o descarte precoce de doadoras portadoras de alterações adquiridas (fato que pode impedi-las de reproduzir de forma natural ou por transferência de embriões) (FIGUEIREDO; GONÇALVES; VISINTIN, 2008; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; WU, 2011).

Dessa forma, à medida que os pesquisadores reconhecem a relevância e a necessidade do aprimoramento da PIVE, sua importância para a saúde reprodutiva humana e animal; bem como a importância dessa técnica para uma melhor produção e qualidade na, e também, para o controle da insuficiência alimentar que se aproxima, seus estudos beneficiarão a todos os indivíduos envolvidos nas diferentes aplicações da produção de embriões *in vitro*. Portanto, é pertinente que os grupos de pesquisas, públicos e/ou privados, sigam no desenvolvimento de novas tecnologias para a

compreensão e o aprimoramento das técnicas envolvidas durante todo o processo de produção *in vitro* de embriões (BLONDIN, 2015).

### 3. Contexto Histórico

Pesquisas com animais marinhos foram pioneiras devido sua fecundação ocorrer externamente ao sistema reprodutor da fêmea, favorecendo a análise dos eventos. Os primeiros feitos relacionados à reprodução assistida referem-se à observação da fertilização de um oócito por um espermatozoide em estrela do mar com formação da primeira célula embrionária; e datam do século XIX, nos anos de 1877 e 1879, realizadas pelo pesquisador Hermann. (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

A primeira tentativa de fertilização *in vitro* em mamíferos foi realizada em coelhos no ano de 1878 pelo pesquisador Samuel Leopold Schenk (ZHU, 2009). A utilização desses animais auxiliou os estudos devido o oócito possuir maior dimensão e sua ovulação ocorrer induzida pelo acasalamento (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986 apud GALLUPO, 2005). Ainda, em seus estudos, Schenk observou que a divisão celular embrionária ocorria após a adição dos espermatozoides (ZHU, 2009).

Os primeiros trabalhos descrevendo os estágios embrionários pré-implantacionais datam de 1875, realizados pelo pesquisador Beneden. Já Heape, em 1890, descreveu a transferência de embriões para oviduto. Em 1929 os pesquisadores Lewis e Gregory produziram um filme sobre as clivagens de uma mórula (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986 apud GALLUPO, 2005). Com o tempo, outros estudos surgiram demonstrando que os oócitos e espermatozoides precisavam passar por algumas etapas de capacitação até serem aptos a executar a fertilização (BAVISTER, 2002; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008, ZHU, 2009).

Entretanto, os meios de cultivo utilizados ainda eram limitantes para o sucesso da técnica de PIVE. Apenas no século XX, estudos concretos e satisfatórios foram desenvolvidos e levaram a progressos significativos com relação ao cultivo *in vitro* de embriões (PASSOS et al., 2002). Na década de 50, Wesley Whitten criou uma formulação para coleta e cultivo de embriões, a qual aprimorou o desenvolvimento embrionário *in vitro*, acarretando em clivagens de embriões murinos com uma célula

até o estágio de blastocisto; para mais, também aumentou o sucesso de implantação de embriões. A partir de então, Ralph Brinster e Whitten uniram-se para estudar as necessidades nutricionais do embrião em cada fase do seu desenvolvimento, levando a elaboração da técnica de cultura de microgotas, a qual é utilizada mundialmente na área humana e animal até os dias atuais (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986 apud GALLUPO, 2005).

Somente em 1959 Min Chueh Chang obteve êxito com a técnica em mamíferos e conseguiu alcançar a fertilização *in vitro*, gestação e nascimento da progênie de uma coelha (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008, ZHU, 2009). Referente aos animais de produção, os primeiros relatos de MIV e FIV com bovinos datam da década de 70, onde Iritani e Niwa realizaram a maturação e a fecundação *in vitro* de oócitos bovinos; e em 1982 foi relatado o primeiro nascimento dessa espécie. Na mesma época, relatou-se nascimento de pequenos ruminantes, como ovinos e caprinos a partir de FIV (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Desde então muitos esforços foram feitos para o progresso da técnica e a potencial aplicação em humanos (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Finalmente, em 1978 Robert Edwards e Patrick Steptoe obtiveram sucesso no nascimento do primeiro bebê a partir de fertilização *in vitro* (ZHU, 2009). Em meados de 1930 e 1960, as técnicas de sincronização de estro, inseminação artificial, transferência de embriões (TE) e criopreservação de sêmen, fomentaram a expansão dos horizontes da agropecuária, possibilitando a importação e a exportação de alta genética com biossegurança, reduzindo a necessidade de transporte de animais vivos (BLONDIN, 2015).

No início da década de 90, a implementação da ultrassonografia – a qual permitiu a aspiração folicular transvaginal *in vivo* (*ovum pick-up* – OPU) -, foi o impulso necessário para a implementação da PIVE em escala comercial, pois possibilitou que todo o processo de geração de embriões fosse realizado totalmente em laboratório (PAVÃO, 2009). Com isso, a fertilização *in vitro*, o congelamento de embriões, a sexagem de sêmen, a transgenia e a clonagem aceleraram o processo de geração de embriões em um pequeno espaço de tempo, expandido a seleção genética dos rebanhos e a aplicação comercial da produção *in vitro* de embriões (BLONDIN, 2015; FIGUEIREDO; GONÇALVES; VISINTIN, 2008).

A OPU, amplamente utilizada na recuperação de oócitos para acompanhamento do desenvolvimento embrionário inicial, não fornece subsídio

suficiente para elucidar as etapas de capacitação oocitária e espermática bem como os eventos que ocorrem durante a fertilização (BAVISTER, 2002; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; ZHU, 2009).

Assim sendo, a crescente expansão da utilização da PIVE, devido ao seu potencial de aplicação para as espécies humana e animal e sua expressividade para ciência básica e aplicada - que já foi desenvolvida, e que ainda se tem a desenvolver -, incentivos ao seu maior conhecimento e progresso devem seguir sendo realizados (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

#### **4. Maturação *in vitro* (MIV) de oócitos**

O oócito apresenta em sua estrutura, uma membrana plasmática, envolta por uma matriz extracelular denominada zona pelúcida, que é recoberta por camadas de células foliculares, denominada *cumulus* (Figura 1). A camada mais interna do *cumulus*, em contato direto com o oócito chama-se corona radiata. Além disso, no interior da célula, estão presentes: núcleo, citoplasma, proteínas, RNA mensageiros que participam da síntese proteica, fatores morfogenéticos, que dirigem a diferenciação de células em determinados tipos celulares específicos (GILBERT, 2000).

A maturação *in vitro* de oócitos (MIV) é uma técnica onde oócitos imaturos, coletados de folículos antrais de tamanho médios, são cultivados afim de adquirir completa maturação (Figura 1). Posteriormente pode ser utilizado para fertilização *in vitro*, afim de produzir embriões para serem transferidos, congelados ou utilizados em pesquisas. (GILCHRIST, 2011). Com o propósito de aperfeiçoar a técnica de produção *in vitro* de embriões, diversos estudos têm sido desenvolvidos para compreender e avaliar cada um dos pontos da PIVE particularmente, visando aprimorar todas as etapas implicadas no processo (PAVÃO, 2009).

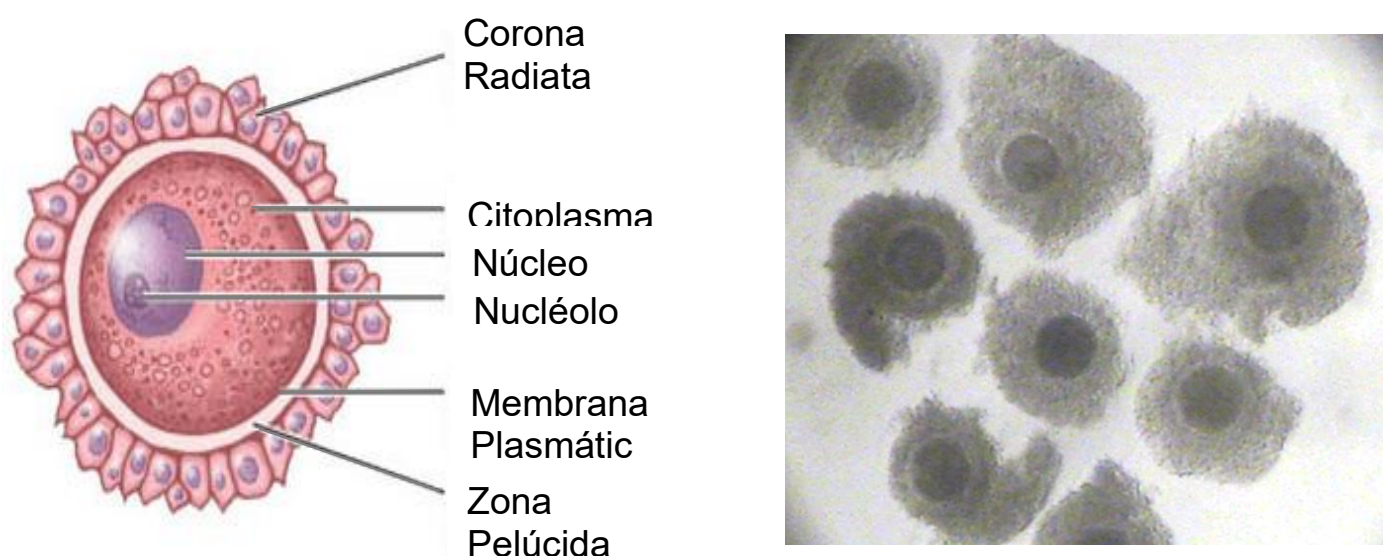


Figura 1. A. Representação da estrutura básica de um oócito. B. Oócitos bovinos antes da maturação *in vitro*. (Adaptado de *BIOLOGY4ISC*, 2016; Extraído de *FILHO et al.*, 2013)

A qualidade do oócito está relacionada com sua competência de desenvolvimento, ou seja, sua capacidade de completar meiose, ser fertilizado, suportar o desenvolvimento pré-implantacional embrionário e o desenvolvimento fetal até a produção de uma prole saudável (BARRETTO, 2007; GILCHRIST, 2011; PAVÃO, 2009). O conhecimento das necessidades metabólicas do oócito em cultivo é primordial para que se estabeleçam condições ideais para que um maior número de oócitos imaturos consigam atingir a maturação de forma competente e com isso serem hábeis a fertilização e à sustentação do desenvolvimento embrionário (BARRETTO, 2007; PAVÃO, 2009).

Em mamíferos, a oogênese inicia durante a vida fetal, ocorrendo o começo da primeira divisão meiótica antes do nascimento (MOORE; PERSAUD, 2008). Há uma parada na fase de prófase da meiose I e a retomada do ciclo meiótico somente na puberdade, quando ocorrem as ondas pré-ovulatórias de hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (WRENZYCKI, 2016). Então, o folículo cresce e o oócito segue a maturação, aumentando de tamanho e completando sua primeira divisão meiótica, progredindo até estágio de metáfase da meiose II, onde se mantém parado em um segundo bloqueio meiótico, o qual só é revertido caso haja

fecundação. Este é o ponto em que ocorre a ovulação, ou oocitação, em que há a liberação do oócito do folículo para o oviduto (MOORE; PERSAUD, 2008; WRENZYCKI, 2016).

O processo que ocorre entre a prófase I até a metáfase II é denominado maturação oocitária. Nessa etapa ocorrem diversas alterações nucleares, citoplasmáticas e moleculares (MINGOTI, 2007 apud PAVÃO, 2009). A qualidade dos blastocistos produzidos é determinada pela qualidade dos oócitos maturados (BORUSZEWSKA et al., 2015). É necessário compreender como ocorre ativação do oócito para que siga até metáfase II e também os mecanismos envolvidos na maturação; no entanto, esse sistema ainda é pouco conhecido (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

A maturação nuclear consiste em alterações na configuração da cromatina, caracterizando a continuidade do ciclo celular, com o desaparecimento do nucléolo, a condensação da cromatina, a extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) e a formação do fuso meiótico. Nessa etapa o oócito alcança a metáfase II, e assim, considera-se que a maturação nuclear está completa (MINGOTI, 2007 apud PAVÃO, 2009).

Já a maturação citoplasmática abrange várias modificações bioquímicas e estruturais, dentre elas: redistribuição das organelas intracelulares, estocagem de proteínas e ácido ribonucleico (RNA), e modificações do citoesqueleto (CHAVES et al., 2010, MINGOTI, 2007 apud PAVÃO, 2009). Tais processos são necessários para que o oócito seja capaz de ser fecundado e para que suporte o desenvolvimento embrionário (CHAVES et al., 2010).

Com relação à maturação molecular, existem genes candidatos descritos na literatura cujo suas expressões em oócitos estão ligados a competência de desenvolvimento embrionário. Dentre os genes, existem os fatores de transcrição, como o octâmero ligado ao fator de crescimento 4 (OCT - 4), à região determinante do sexo - Y (SOX2), onde os níveis de expressão estão relacionados com a pluripotência, a diferenciação celular e à regulação do desenvolvimento embrionário precoce (BORUSZEWSKA et al., 2015).

Também existem estudos demonstrando a presença de RNA mensageiro (mRNA) de receptores para fatores de crescimento ligados à insulina (IGF1R e IGF2R), os quais são correlacionados com a melhor morfologia e potencial de crescimento dos embriões. Outros genes utilizados como marcadores moleculares

são os genes da família BCL2 (Células B de Linfoma 2), os quais são marcadores do potencial de desenvolvimento (BORUSZEWSKA et al., 2015).

Com relação aos genes responsáveis pela síntese e estabilização da matriz do *cumulus* desde o final da maturação, passando pela ovulação e estabilidade durante a fertilização tem-se: Anfirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC) (BORUSZEWSKA et al., 2015, MIKICH, 2008a). Fatores ligados ao Fator de Crescimento Epidermal (EGF) nas células do *cumulus* via receptor de EGF (EGFR) e mediado por LH, incluem Prostaglandina G / H sintase 2 (PTGS2), proteína 6 induzida pelo fator de necrose tumoral alfa (TNFAIP6), pentraxina 3 (PTX3) (BORUSZEWSKA et al., 2015, MIKICH, 2008a)

A expansão do *cumulus* depende do ácido hialurônico, o qual é produzido por hialuronano-sintase 2 (HAS2) a partir de vários compostos, incluindo a glucosamina e a glicose. A glicose é metabolizada para ácido hialurônico pelas células do *cumulus* (BORUSZEWSKA et al., 2015). Assim, estes e outros genes expressos pelas células do *cumulus* determinam a interação *cumulus*-oócito e o desenvolvimento inicial do embrião (MIKICH, 2008a).

Já foi relatado que oócitos competentes possuem maior quantidade de mRNA, alguns destes codificam o Fator Intracelular Promotor da Fase M (FPM). O FPM é um complexo derivado da união da ciclina B e da proteína cinase, cdk1 também descrito como um regulador universal do ciclo celular tanto na mitose como na meiose (CHAVES et al., 2010; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Em sua forma inativa, a proteína cdk1 está fosforilada em treonina 161, treonina 14 e tirosina 15; para sua ativação é necessária desfosforilação dessas proteínas. Quando em atividade, a cdk1 fosforila diversas proteínas que controlam o equilíbrio do filamento do citoesqueleto; como por exemplo as histonas (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

O bloqueio meiótico no estágio de vesícula germinativa, que ocorre até a puberdade, é mantido pelas concentrações elevadas de cAMP (Monofosfato cíclico de adenosina), produzido pelas células da granulosa e transportado ao oócito através das junções GAP. Na puberdade, as ondas de LH promovem o declínio de cAMP, por meio do desligamento das junções GAP entre oócito e células da granulosa, e também, através da redução da sua produção por estas células (CHAVES et al., 2010).



Esse declínio do cAMP provoca desfosforilação e ativação do MPF, que irá promover quebra do envelope nuclear, condensação da cromatina e reorganização do citoesqueleto. Além disso, com a quebra da vesícula germinativa ocorre a duplicação dos centríolos e os cromossomos em pares migram para região equatorial, caracterizando a metáfase I (CHAVES et al., 2010). Ainda, quando os oócitos são cultivados com a presença das células foliculares *in vitro*, a Angiotensina II (Ang II), promove a reversão do efeito inibitório de divisão celular das células da teca, promovendo a maturação nuclear do oócito bovino; promovendo a maturação nuclear *in vitro* (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

O MPF utiliza como substrato a histona H1 cinase e a sua alta atividade ocorre em metáfase I e metáfase II. Após a fase de crescimento, há um aumento da atividade da proteína cdk1 fazendo com que os oócitos completam a maturação. Os níveis de cdk1 se mantêm elevados após a maturação do oócitos e vão diminuindo com tempo, ou de forma abrupta com a fecundação (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

O sistema *in vitro* ideal ao desenvolvimento oocitário é o que permite que eles atinjam o crescimento, a competência e a maturação completa. Vários sistemas de cultivo têm sido desenvolvidos e dependem do estágio inicial do oócito e do tempo necessário para maturação naquela espécie. Na espécie bovina, a maturação dura de 18 a 24 horas (CHAVES et al., 2010), em equinos 30 a 36 horas (SQUIRES, 1996), e em ovinos 24 horas (SZÖLLÖSI, 1988). Para essa finalidade, já foram testados diferentes meios de cultivo, sendo o mais difundido o TCM 199 (meio de cultivo tecidual 199), onde normalmente é suplementado com FSH, LH, piruvato, bicarbonato de sódio, HEPES, glutamina, antibiótico e soro fetal bovino (SFB), afim de suprir os nutrientes, vitaminas, fatores de crescimento e componentes antioxidantes para a maturação do oócito (CHAVES et al., 2010; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; PAVÃO, 2009).

Além do meio utilizado, existem outros fatores relacionados considerados fundamentais à maturação do oócito Elementos como: osmolaridade, composição iônica, temperatura, CO<sub>2</sub>, tensão de oxigênio (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Na MIV, sob alta tensão de oxigênio, é necessário aumentar a concentração de glutathione, e baixar a concentração de glicose, para diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio. Quando em baixa tensão de oxigênio há diminuição das espécies reativas de oxigênio e inibição da produção de adenosina

trifosfato (ATP), e, conseqüente, inibição da progressão até metáfase II. Para contornar isso é adicionado glicose, o que faz com que aumente a proporção de oócitos que atingem a metáfase II (CHAVES et al., 2010).

Com relação à temperatura, é prejudicial que os oócitos sejam expostos à quando ocorre choque térmico, pois faz com que ocorram alterações no citoesqueleto inviabilizando o prosseguimento do desenvolvimento (CHAVES et al., 2010). Para as condições ideais à maturação, é necessária estufa que mantenha a atmosfera gasosa e temperatura. Na maioria das vezes, para a espécie bovina, a maturação ocorre a 39°C por 22 a 24 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e umidade saturada (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Todos esses eventos demonstram a importância da maturação oocitária para o sucesso da fertilização e do desenvolvimento embrionário. Como é esperado, as melhores taxas de produção *in vitro* de embriões são alcançadas quando se utiliza oócitos maturados *in vivo*, os quais levam a taxas de produção de blastocistos para 70% contra cerca de 30% provenientes de oócitos maturados *in vitro* (PAVÃO, 2009). Este baixo sucesso nas taxas de produção de embriões provenientes de oócitos maturados *in vitro* é atribuído à população heterogênea de oócitos recuperados a partir de folículos de 3-8 mm que são aspirados, os quais não são folículos pré-ovulatórios. Outra possível razão para isso pode ser o pouco conhecimento dos mecanismos envolvidos no eixo de comunicação intrínseco entre o oócito e células somáticas foliculares. (GILCHRIST, 2011; WRENZYCKI, 2016).

Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa têm trabalhado para o aprimoramento da maturação *in vitro*. Estudos com suplementações ao meio de maturação que possam otimizar o processo de maturação do oócito e levar ao desenvolvimento embrionário (CHAVES et al., 2010). Já foram descritas suplementações com diversos fatores e moléculas, como: fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de fibroblásto (FGF), fator de crescimento de diferenciação 9 (GDF-9), proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15), melatonina, melatonina nanoencapsulada (CHAVES et al., 2010; REMIÃO et al., 2016, TIAN et al., 2014).

Ainda, estudos voltados à melhora da maturação dos oócitos após sua retirada do ambiente folicular devem ser incentivados, uma vez que o simples fato de removê-los desse ambiente acarreta no reinício da meiose. Dessa forma, podem ser apanhados oócitos que não tenham maturação suficiente para suportar a fertilização

e o desenvolvimento embrionário, sendo essa uma etapa fundamental no processo de PIVE (FIGUEIREDO; GONÇALVES; VISINTIN, 2008). Assim, é importante aprimorar o conhecimento dessa temática para o entendimento do processo de maturação como um todo e abrir novas oportunidades em tecnologias reprodutivas artificiais (GILCHRIST, 2011).

## **5. Técnicas de fecundação *in vitro* de oócitos**

### **5.1 Fertilização *in vitro* (FIV)**

Os espermatozoides são células altamente especializadas que entregam o material genético do macho a célula gamética feminina. As células espermáticas são produzidas nos testículos através de um processo denominado de espermatogênese. Existem variações na morfologia dos espermatozoides entre diferentes espécies (PRAKASH et al., 2014). As estruturas que compõem a morfologia básica desse tipo celular são: a cabeça, que contém o DNA e o acrossoma o qual possui enzimas proteolíticas, como acrosina, tripsina e hialuronidase, as quais são liberadas durante a reação do acrossoma, a hidrólise das células granulares e também auxilia a ligação e penetração do espermatozoide no oócito; a peça intermediária, a qual possui um filamento axial rodeado por fibrilas com disposição circular e um ou dois centríolos onde estão localizados elementos celulares. Essa porção contém, ainda, centríolos, microtubulos, mitocôndrias, e enzimas envolvidas na glicólise e em sistemas de oxidação, fornecendo energia necessária para sobrevivência e motilidade celular; e o flagelo, composto por dez pares de fibras, permitindo a movimentação da célula gamética (Figura 2) (GEORGADAKI et al., 2016; PRAKASH et al., 2014).

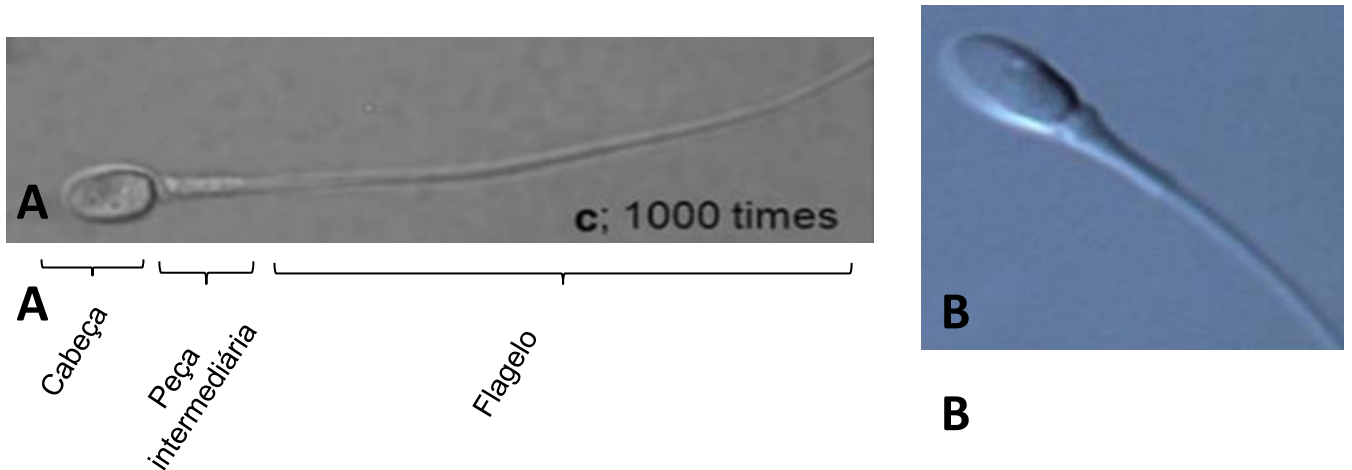


Figura 2. A e B, representação anatômica de um espermatozoide. Adaptado de UGAJIN, 2010.

Desde as primeiras pesquisas relacionadas à fecundação, realizadas com estrelas do mar, diversos avanços foram realizados agregando conhecimento sobre fertilização. Estudos sobre novas técnicas como a inseminação artificial possibilitou a percepção de que o espermatozoide necessita de um tempo no sistema reprodutor feminino antes de adquirir capacidade de penetrar no oócito. (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). Após a ejaculação, os espermatozoides não possuem capacidade total de fertilização, é necessário que eles passem por um período de condicionamento para que se tornem competentes para a fertilização. Nesse período, ocorrem mudanças moleculares, bioquímicas e fisiológica na célula espermática, que são coletivamente chamadas de capacitação espermática (SALICIONI, 2007)

A capacitação espermática é um importante pré-requisito para fertilização. Durante esse processo, ocorre a remoção de decapacitantes presentes no plasma seminal, basicamente glicoproteínas e proteínas que recobrem a superfície do acrossoma (JIN; YANG, 2017; MOORE; PERSAUD, 2008; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). As principais alterações bioquímicas, durante a capacitação espermática, constituem-se da remoção do colesterol, que acarreta o aumento da fluidez da membrana espermática; também ocorre a entrada de cálcio intracelular, aumento da concentração de cAMP, alterações na concentração de ions intracelulares e nas atividades enzimáticas (JIN; YANG, 2017; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008).

Essas modificações levam a uma alteração transitória na motilidade espermática, chamada de hiperativação, caracterizada por um movimento rápido, linear e progressivo, que ocorre de maneira espontânea e tempo dependente com a reação acrossômica. Além disso, esses eventos não alteram a morfologia da célula. (JIN; YANG, 2017; MIKICH, 2008b; MOORE; PERSAUD, 2008; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). Para completar o procedimento de capacitação, os espermatozoides hiperativos se ligam a proteínas da zona pelúcida (ZP). Após a capacitação espermática, ocorre a ligação primária entre o oócito e o espermatozoide. Tal ligação é promovida através de receptores da membrana plasmática do espermatozoide, denominados ZP3 (proteína da zona pelúcida), provocando a indução da reação acrossômica (RA) (ICKOWICZ; FINKELSTEIN; BREITBART, 2012; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008).

A RA é caracterizada pela liberação do conteúdo do acrossoma após a fusão da membrana acrossomal com externa e a membrana do oócito. É um importante evento para a fertilização pois permite a passagem do espermatozoide através da ZP e subsequente fusão com o oócito (ICKOWICZ; FINKELSTEIN; BREITBART, 2012). É um processo de exocitose, dependente de cálcio, onde há a liberação de enzimas hidrolíticas que facilitam a penetração do espermatozoide na zona pelúcida a partir da digestão da sua matriz. Além disso, também ocasionam modificações nas membranas da região pós acrossômica, onde ocorre a ligação entre o oócito e o espermatozoide (ICKOWICZ; FINKELSTEIN; BREITBART, 2012; MIKICH, 2008b; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008).

Quando o espermatozoide entra em contato com o oócito, as membranas plasmáticas se rompem na área de fusão e o conteúdo intracelular do espermatozoide entra no citoplasma do oócito (MOORE; PERSAUD, 2008). Após a penetração do espermatozoide ocorre uma mudança nas propriedades da ZP conhecida como reação zonal. As modificações da ZP a torna mais resistente e provoca a perda de receptores espermáticos impedindo a polispermia (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Acredita-se que as alterações ocorram pela rápida despolarização da membrana após a fecundação e através da fusão de grânulos corticais com a membrana plasmática. As enzimas (hidrolíticas, proteolíticas e peroxidases) presentes nos grânulos corticais, são liberadas no espaço perivitelino provocando a hidrólise das proteínas da zona pelúcida. Tais modificações ocorrem a partir da ativação do oócito

que leva, também, ao início das clivagens (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; MOORE; PERSAUD, 2008).

O método de indução da capacitação de espermatozoides bovinos para fertilização *in vitro* que se mostrou mais eficiente foi a utilização de heparina, que é um glicosaminoglicano presente em altas concentrações no trato reprodutivo de fêmeas bovinas. Considera-se que a heparina promova a capacitação espermática ao ligar-se induzindo alterações nas proteínas da membrana plasmática, ativando canais iônicos e aumentando o cálcio intracitoplasmático (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008).

Com a penetração do espermatozoide, ocorre o estímulo para o prosseguimento da segunda divisão meiótica. Nesse momento os cromossomos do oócito são envoltos por uma membrana nuclear originando o pronúcleo feminino. Ao mesmo tempo, ocorre a desintegração da membrana nuclear do espermatozoide, a descondensação da cromatina pela remoção de proteínas nucleares e ocorre a formação de uma nova membrana, originando o pronúcleo masculino. Os pronúcleos migram para o centro do ooplasma, onde há associação dos cromossomos e inicia a primeira divisão mitótica (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). A figura 4 demonstra as diversas etapas da fertilização previamente descritas, bem como as estruturas celulares oocitárias. (Figura 4).

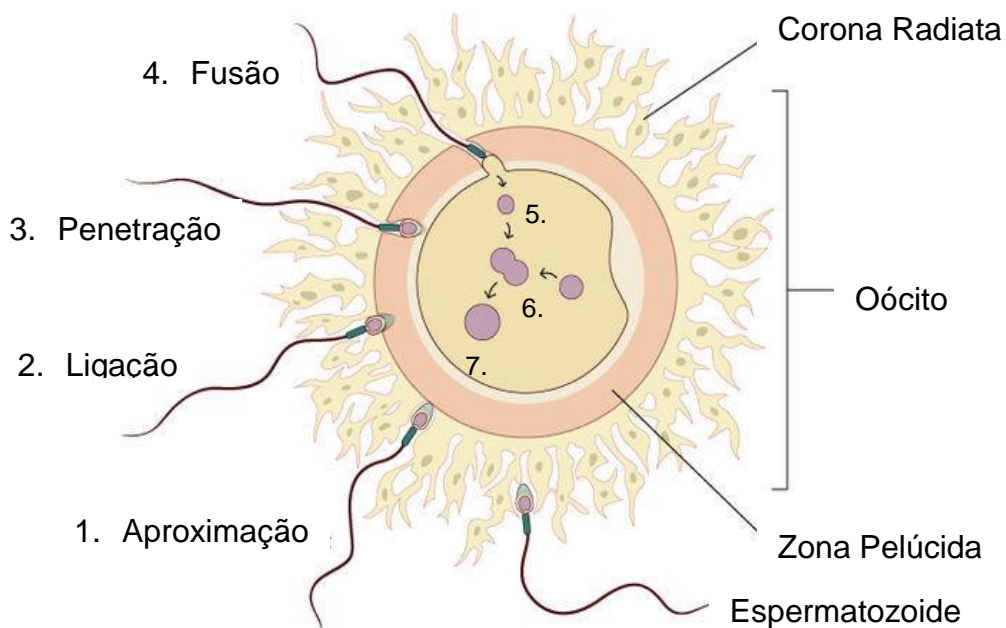


Figura 5. Etapas da fecundação. 1. Aproximação do espermatozoide; 2. Ligação à zona pelúcida; 3. Penetração na zona pelúcida; 4. Fusão das membranas plasmáticas do espermatozoide e do oócito; 5. Formação do pró-núcleo masculino; 6. Fusão dos pró-núcleos feminino e masculino. 7. Zigoto formado com núcleo diploide cromossomal que seguirá para primeira divisão mitótica. Adaptado de BIOTECHNOLOGY LEARNING HUB, 2016.

Em laboratórios, de PIVE em bovinos, na maioria das vezes, para realização da fertilização *in vitro*, é utilizado sêmen congelado (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). Assim, após o descongelamento do sêmen é necessário a separação e seleção dos espermatozoides vivos. Essa técnica deve ser rápida e simples; bem como, possuir capacidade de recuperar a maioria dos espermatozoides móveis, sem resultar em alterações espermáticas. Também deve permitir a remoção dos espermatozoides mortos, microorganismos, substâncias tóxicas, e possibilitar o controle de concentração final. Para tal, existem algumas técnicas utilizadas como gradiente de densidade, *Swim up* e lavagem simples (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008).

A técnica de *swim up* consiste na separação dos espermatozoides vivos dos mortos, do plasma seminal, e componentes diluidores através da motilidade ascendente. A metodologia consiste, primeiramente, em depositar o sêmen descongelado no fundo do tubo e em seguida cobrir por meio específico (Sperm - Tyrode-albumina- lactato-piruvato - SP-TALP). Após, o tubo é colocado em ambiente a 39°C ou ainda nas estufas incubadoras com 5% CO<sub>2</sub> com umidade saturada, permitindo que os espermatozoides migrem para posição superior do meio e os demais constituintes do sêmen descongelado permaneçam na parte inferior do tubo. Posteriormente, o sobrenadante é aspirado e transferido para outro tubo e submetido a centrifugação por 5 minutos. Terminada a centrifugação, o *pellet* é recolhido e é feito o ajuste da concentração (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

No método de separação com gradiente de densidade um dos meios mais utilizados é o Percoll, o sêmen é centrifugado e passado por diferentes gradientes de concentrações para permitir a separação dos espermatozoides vivos dos demais constituintes do sêmen a partir da diferença de densidade. Uma das formas de preparação das densidades, é a partir da diluição do Percoll para obtenção da solução Percoll 90% e a partir desse prepara-se Percoll 45% na proporção 1:1 utilizando meio SP-TALP. O gradiente é montado, colocando a concentração mais baixa (45%) na parte de cima e a mais alta (Percoll 90%) embaixo. O sêmen descongelado é depositado na parte de cima do gradiente, e então o tubo é centrifugado de acordo com o protocolo do laboratório; após, o sobrenadante é removido e adiciona-se o meio SP-TALP para uma segunda lavagem. Posteriormente o *pellet* formado é utilizado para fertilização (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Após o descongelamento e preparação dos espermatozoides, esses são colocados em sistemas de cocultivo com os oócitos. O protocolo varia entre laboratórios. É muito importante que o meio utilizado forneça as condições para que a penetração do espermatozoide ocorra da maneira mais rápida possível (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). O meio base normalmente utilizado é Tyrode-albumina-lactato-piruvato (TALP) acrescido de bicarbonato de sódio, 0,6% de Albumina Sérica Bovina (BSA), além das fontes de energia lactato e piruvato (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). O processo de cocultivo é realizado por um período de 18 a 22 horas, com temperatura a 39°C, em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturados para a espécie bovina (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Mesmo já conhecendo os mecanismos básicos que envolvem a capacitação espermática e os demais processos para fertilização, ainda existe a necessidade de estudos para tentar elucidar todos os mecanismos, genes e enzimas envolvidas durante o procedimento como um todo (FRASER, 2010). Já existem estudos mostrando a suplementação e/ou a substituição de alguns componentes do meio utilizado na FIV com diversas substâncias, entre elas a Metil-β-Ciclodextrina, L-arginina e melatonina, a fim de aprimorar os resultados já obtidos, principalmente em relação à capacitação espermática (ÁGUILA et al., 2015; CHEUQUEMÁN et al., 2015; SANTANA et al., 2016).

## **5.2 Injeção Intracitoplasmática (ICSI)**

Uma variação da FIV que tem sido bastante utilizada é a injeção intracitoplasmática. A ICSI consiste em selecionar um único espermatozoide e injetá-lo, inteiro ou só a cabeça, diretamente no citoplasma do oócito, ultrapassando todas as barreiras naturais envolvidas na penetração do espermatozoide (BAVISTER, 2002; MARTINS; SILVA; RUMPF, 2002).

A técnica iniciou com Uehara e Yanagimachi em seus experimentos com hamster, a qual foi posteriormente executada em ratos por Thadani, e somente muito tempo depois, realizou-se em humanos, auxiliando a contornar problemas de infertilidade masculina. Hoje já é uma técnica bastante difundida e amplamente



utilizada em diferentes espécies (SEIDEL, 2015). Em bovinos a primeira produção de blastocistos foi registrada em 1996 por Goto e colaboradores (MARTINS; SILVA; RUMPF, 2002; ZAMBRANO et al., 2016).

Dentre as principais aplicações da ICSI, para animais não humanos, destacam-se a utilização para fecundação com sêmen sexado, sêmen de má qualidade, sêmen de animais com alto mérito genético, produção de animais transgênicos ou ainda em raças e espécies ameaçadas de extinção (MARTINS; SILVA; RUMPF, 2002; ZAMBRANO et al., 2016). A ICSI tem a vantagem de permitir a utilização de diferentes tipos espermáticos para promover a fecundação, sendo necessário apenas que a célula espermática esteja viável e que o núcleo apresente cromossomos haploides. Dessa forma, células espermáticas de diferentes locais (ejaculado, epidídimo e testículo) podem ser utilizadas (MARTINS; SILVA; RUMPF, 2002).

Com relação a preparação das células gaméticas, é realizada, em oócitos maturados, a remoção das células do *cumulus* e lavagem dos mesmos antes da ICSI. Os oócitos que já apresentam primeiro corpúsculo polar são selecionados e separados para realização da microinjeção. Quanto ao sêmen, primeiramente a palheta é descongelada e a seleção dos espermatozoides é realizada através do gradiente de Percoll (MARTINS; SILVA; RUMPF, 2002).

A microinjeção é executada utilizando microscópio invertido equipado com micromanipuladores onde são acopladas pipetas de micromanipulação, onde uma é a pipeta de retenção (*holding*) que segura o oócito e a outra, é a pipeta de injeção, que aspira o espermatozoide para depois injetá-lo dentro do citoplasma do oócito (MARTINS; SILVA; RUMPF, 2002; ZAMBRANO et al., 2016). Primeiramente, o oócito é fixado horizontalmente na *holding* colocando o corpúsculo polar na posição de 6 ou 12 horas (ZAMBRANO et al., 2016). Após, a pipeta de injeção é direcionada para posição de 3 horas, e é realizada a perfuração da ZP. Como garantia de rompimento da membrana plasmática e de que o espermatozoide está depositado no local correto, o citoplasma é aspirado para dentro da pipeta e depois é empurrado novamente juntamente com o espermatozoide (MARTINS; SILVA; RUMPF, 2002).

Estudos realizados com coelhos, ratos, equinos e humanos demonstraram que após a ICSI o espermatozoide por si só tem capacidade de ativar o oócito para produção do embrião e posterior desenvolvimento embrionário. No entanto, essa ativação não ocorre na espécie bovina, reduzindo drasticamente a taxa de produção de embriões utilizando a técnica de ICSI (LEE et al., 2015). Dessa forma, é necessária

a realização de uma ativação do oócito recém fecundado. Tal processo é realizado através de exposição ao cálcio ionóforo, etanol, corrente elétrica, dentre outras técnicas (MARTINS; SILVA; RUMPF, 2002). Mesmo assim, a ativação quando realizada apenas com um tratamento, ainda não é suficiente, dessa forma, é necessário realizar uma combinação de agentes ativadores (LEE et al., 2015). Após esse procedimento o ovócito é incubado com tampão fosfato-salino (PBS) e BSA para bloquear o processo de ativação e em seguida é passado para o meio Synthetic Oviductal Fluid (SOF) onde permanece em cultivo por 7 dias (MARTINS; SILVA; RUMPF, 2002).

Entretanto, a técnica apresenta baixa eficiência, principalmente na espécie bovina, o que se deve à baixa descondensação da cromatina do espermatozoide, que conseqüentemente dificulta a formação do pronúcleo masculino e posterior desenvolvimento embrionário. Isso deve-se à baixa permeabilidade da membrana plasmática e do acrossoma do espermatozoide, que na ICSI é injetado mecanicamente no oócito (MARTINS; SILVA; RUMPF, 2002). Alguns estudos têm sido realizados a fim de aumentar a permeabilidade e remoção da membrana do acrossoma para que a descondensação ocorra de maneira mais rápida e eficiente. Algumas técnicas já foram descritas a fim de favorecer a formação do pronúcleo como, o congelamento e o descongelamento, a utilização de químicos como Triton X-100; lisolecitina e brometo de alquil trimetil amonero; ditioneitol e glutathione para quebra das pontes dissulfetos do ácido desoxirribonucleico (DNA) espermático (LEE et al., 2015; MARTINS; SILVA; RUMPF, 2002).

Portanto, ainda é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para o aperfeiçoamento da ICSI, principalmente na espécie bovina. É importante encontrar novos métodos de ativação do ovócito bem como de capacitação espermática para melhorar a técnica e aumentar a produção de embriões a partir de injeção intracitoplasmática. Tendo em vista as oportunidades de aplicações da ICSI, essa é uma importante ferramenta biotecnológica que possui um vasto campo de estudo e aplicações para serem explorados (MARTINS; SILVA; RUMPF, 2002).

### 5.3 Transgênese Animal

A transgênese objetiva produzir animais que possuam uma incorporação estável de fragmentos de DNA exógeno em todas suas células, incluindo os gametas. Assim, tais animais poderão servir como animais matrizes de rebanhos uma vez que gerarão progênes portadoras do gene introduzido (COLLARES, et al., 2005; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Alguns dos grandes marcos para biotecnologia moderna, no que tange a transgênese, refere-se inicialmente aos primeiros sucessos na transferência de genes em animais em meados de 1980. Brinster e colaboradores em 1980, através de microinjeção intracitoplasmática de DNA exógeno que codifica para globina de coelhos em camundongo, observaram a tradução do RNA mensageiro e expressão de globina (BRESSAN, 2008; BRINSTER, 1980; CAMPOS, 2008). A geração de ratos transgênicos por injeção pronuclear em zigoto a fim de expressarem o gene do hormônio do crescimento e, mais recente, se teve a comercialização de insulina recombinante para terapia humana, produzida por bactérias geradas por engenharia genética. Desde então, as aplicações vêm sendo expandidas e disseminadas para diferentes áreas (BARTON-DAVIS, 1998; CAMPOS, 2011; JAENISCH e MINTZ 1974).

Os animais transgênicos são bastante utilizados para entendimento da função dos genes *in vivo*, bem como para modelo de estudo de doenças humanas, sendo aplicado também à produção de proteínas recombinantes no leite, órgãos para xenotransplantes, resistência a doenças e melhoramento da produção animal (SOSA; DE GASPERI; ELDER, 2010). O modelo animal mais utilizado para transgênese é o murino devido ao baixo custo, rápida reprodução e fácil manipulação. No entanto, esses animais têm maiores diferenças em relação aos humanos, do que outras espécies, principalmente se tratando da fisiologia, relacionado à características metabólicas e respostas celulares (TAN et al., 2012).

Animais domésticos como ovinos, bovinos e suínos, apesar de maior custo e tempo, apresentam maior proximidade filogenética e fisiológica com humanos (SOSA; DE GASPERI; ELDER, 2010). A utilização desses animais tem se aplicado, principalmente, em duas linhas: na agricultura, com o melhoramento genético; e na

saúde, com a produção de proteínas recombinantes para a terapia de doenças humanas (CAMPOS, 2011).

Diversos trabalhos importantes na área já foram desenvolvidos, como a produção de suínos transgênicos que produzem maior quantidade de leite e lactose, proporcionando o aumento da sobrevivência dos leitões ao desmame, gerando lucros à saúde do animal e ao produtor (WHEELER; BLECK; DONOVAN, 2001). Na espécie bovina, houve a geração de vacas transgênicas resistentes a mastite, nas quais foi inserido gene codificante para proteína lisostafina, que causa resistência a *Staphylococcus aureus*, agente causador dessa enfermidade (WALL et al., 2005).

### **5.3.1 Métodos de produção de animais transgênicos**

O DNA é uma macromolécula que dificilmente consegue introduzir-se nas células. Por esse motivo, são utilizados métodos físico-químicos, como promotores da incorporação do DNA à célula (COLLARES, et al., 2005). Existem diversas metodologias para promover a incorporação de DNA ao genoma a fim da produção de transgênicos, dentre elas: transferência de DNA por retrovírus e lentivírus, microinjeção pronuclear de DNA em zigotos, transferência de DNA mediada por espermatozoides, transferência de DNA mediada por lipossomos, eletroporação de DNA em espermatozoides, zigotos ou embriões, injeção de DNA no testículo para produção de espermatogonias transgênicas (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

#### **5.3.1.1 Microinjeção de DNA**

A tecnologia de transgênese possibilita um maior desbravamento e estudo das funções dos genes além da criação de modelos animais para estudo de doenças humanas. Uma técnica amplamente empregada em diversas espécies é a microinjeção de DNA (LIU et al., 2013). A técnica de microinjeção de DNA consiste na inserção de moléculas de DNA diretamente no pronúcleo do zigoto (GONÇALVES;

FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Para realização dessa metodologia são necessários numerosos oócitos que são obtidos através da aspiração folicular ovariana de fêmeas submetidas a superovulação. Após, os oócitos são fertilizados e os zigotos adquiridos são centrifugados para concentrar os lipídeos em um lado da estrutura a fim de facilitar a visualização do pronúcleo. O DNA a ser injetado deve possuir alta pureza (COLLARES, et al., 2005). Utilizando microscópio acoplado a micromanipuladores, o embrião é imobilizado com uma *holding* de modo individual, e em uma segunda pipeta, *injection*, fica o DNA exógeno que será injetado no pronúcleo do zigoto, um exemplo pode ser visualizado na figura 4 (LIU et al., 2013).

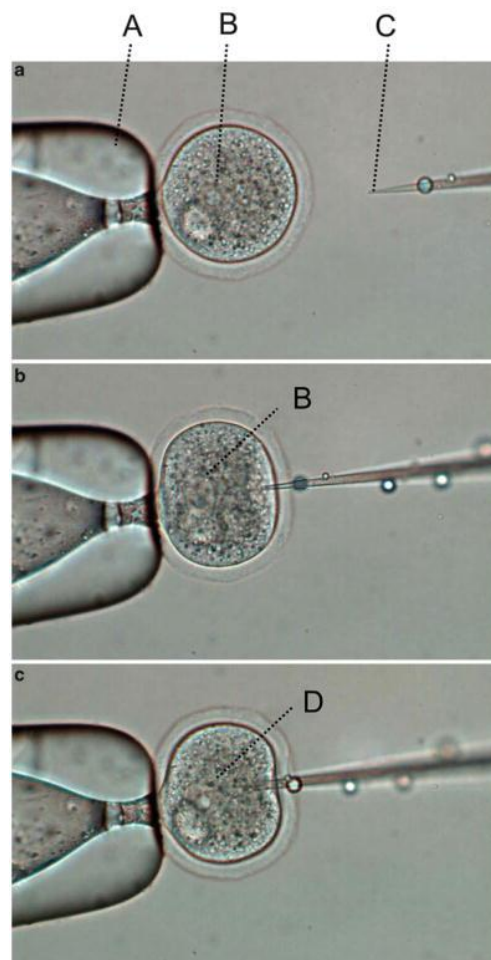


Figura 4: Processo de microinjeção peonuclear de DNA. a. Oócito apanhado e preso pela *holding* (A). Ajuste do foco no microscópio para encontrar um pronúcleo (B) e colocar a *injection* no mesmo plano. b. A *injection* é inserida no zigoto. c. Solução de DNA inserida dentro do pronúcleo. Há expansão do envelope nuclear D, indicando que a microinjeção ocorreu com sucesso. Após, ocorre a remoção da *injection*. Adaptado de LIU et al., 2013.

Após a injeção, os embriões são transferidos para receptoras previamente sincronizadas (COLLARES, et al., 2005). O índice de sucesso da técnica é aproximadamente de 10% em animais domésticos. Dentre as desvantagens da técnica, tem-se: a aplicação não pode ser feita em embriões em estádios mais avançados de desenvolvimento, a difícil detecção do local de inserção do DNA e a baixa frequência de inserção do DNA exógeno (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

#### **5.3.1.2. Infecção viral**

A inserção de DNA exógeno em embriões precoces é uma importante ferramenta no estudo do desenvolvimento e produção de animais transgênicos. Devido ao alto custo da aplicação da microinjeção pronuclear, uma metodologia alternativa bastante promissora é a transgenese a partir de vetores virais (HOFMANN et al., 2003). Nesse sentido tem sido estudado principalmente a utilização de vírus da classe dos lentivírus e retrovírus (MCGREW et al., 2004). Na produção de animais transgênicos, já foi demonstrado êxito na aplicação desses vetores virais em diferentes espécies abrangendo aves, mamíferos, suínos bem como em roedores (HEN et al., 2012; HOFMANN et al., 2003; LOIS; BROWN; BALTIMORE, 2002; PFEIFER et al., 2002) .

##### **5.3.1.2.1. Infecção por retrovírus**

Os retrovírus possuem capacidade natural de infectar células e interagir com o seu genoma. Nessa metodologia, os genes virais são substituídos por genes de interesse e a construção gênica é transferida para células que sintetizam proteínas virais. As células transfectadas secretam partículas retrovirais que são utilizadas para

infectar células embrionárias ou células gaméticas iniciais, originando embrião transgênico (COLLARES, 2005; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

#### **5.3.1.2.1.1. Infecção por lentivírus**

O lentivírus possui a habilidade de infectar células já diferenciadas e que não estão em divisão. Na presente técnica também há remoção dos genes virais e adição do gene de interesse. A construção pode ser introduzida em zigotos através da sua injeção no espaço perivitelínico ou pelo cocultivo com zigotos sem zona pelúcida (COLLARES, 2005; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). A eficiência desse vetor é aumentada com uso de envelopes que reconhecem fosfolipídios da membrana plasmática (COLLARES, 2005).

#### **5.3.1.3 Transferência gênica em células tronco embrionárias**

Células tronco embrionárias são linhagens celulares adquiridas a partir de embriões em fase de desenvolvimento pré-implantacional, principalmente no estágio de blastocisto (COLLARES, 2005). O processo de transferência gênica envolve injeção de células tronco embrionárias contendo o transgene em blastocistos expandidos, com o propósito de produzir embriões híbridos (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Essas células possuem a importante característica de serem pluripotentes, ou seja, possuem capacidade de formar todos os tecidos do indivíduo exceto placenta e anexos embrionários (COLLARES, 2005). A partir das células obtidas do blastocisto é realizada uma transfecção com DNA exógeno seguida de posterior inserção no blastocisto receptor. Dessa forma, o indivíduo formado é quimérico e pode servir de fundador de linhagens transgênicas com o gene (ou genes) de interesse a partir de sua progênie (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

#### **5.3.1.4 Transferência gênica mediada por espermatozoides (SMGT)**

Essa metodologia baseia-se na utilização do espermatozoide como vetor natural para transferência de material genético para o oócito (SMITH; SPADAFORA, 2005). No ano de 1989 foi reportado por Arezzo, F. e também por Lavitrano, M. a descoberta da possibilidade de as células espermáticas associarem-se a moléculas de DNA exógenos e ainda poderem transferir tais moléculas no momento da fertilização (AREZZO, 1989; LAVITRANO, 1989).

O espermatozoide tem capacidade de ligar-se ao DNA livre ou a complexos de DNA-lipossomos (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). A transfecção do DNA é realizada em espermatozoides normalmente colhidos na ejaculação ou diretamente no testículo. Primeiramente realiza-se uma incubação com meio de fertilização por tempo variável, e nos últimos 30-60 minutos a solução de DNA é inserida na suspensão dos espermatozoides (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Após, os espermatozoides são utilizados para técnica de FIV, ICSI ou inseminação artificial (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Existem estudos utilizando diferentes mecanismos para aumentar a introdução do DNA de interesse no espermatozoide (eletroporação de espermatozoides tratamento de espermatozoides com Triton-X , reagentes químicos de transfecção como lipossomos), visto que essa técnica gera diminuição da motilidade espermática e consequente diminuição da capacidade de fertilização; bem como métodos para minimizar a ação de DNAses presentes tanto no plasma seminal quanto no citoplasma do espermatozoide (complexo DNA-lipossomos, DNA ligado a nanopolímeros catiônicos e DNA ligado a nanotubos de haloisita) (CAMPOS, 2011; TANG; GONZALES; DOBRINSK, 2015). Tal metodologia já foi estudada em diferentes espécies, abrangendo dentre elas os bovinos, suínos e espécies aquáticas, os quais tentaram aprimorar o protocolo para uma maior captação de DNA exógeno pelas células espermáticas e ao mesmo tempo garantir a integridade e sobrevivência para não prejudicar a capacidade de fecundação (CANOVAS; GUTIERREZ-ADAN, 2010; ODDI et al., 2012).



### 5.3.1.5 Eletroporação

A eletroporação é uma metodologia que permite a entrega de genes através de um processo físico, por isso é possível aplicá-la em diversos tipos celulares sejam elas animais, vegetais ou microbianas. (JORDAN et al., 2008). Tal processo é empregado na transferência de DNA para células e embriões utilizando pulso elétrico, e consiste em colocar as células alvo em uma solução contendo as cópias do DNA de interesse seguido de um rápido pulso elétrico de alta voltagem. A exposição da solução contendo célula e DNA ao pulso elétrico provoca desestabilização temporária da membrana. acarretando no aparecimento de poros pelos quais o DNA passará (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). A força e a duração do campo elétrico assim como o tampão utilizado são parâmetros essenciais para potencializar a eficiência da transfecção e preservar a viabilidade das células. Cada tipo celular necessita de condições específicas e diferentes umas das outras, sendo necessário realizar prévia determinação desses requisitos. (JORDAN et al., 2008).

. Neumann em 1972, demonstrou alterações na permeabilidade transitória em membranas de vesículas ocasionadas através de impulsos elétricos, estimulando estudos relacionados com essa metodologia (NEUMANN et al., 1972). Posteriormente em 1982 o mesmo autor realizou estudo para aprimorar o protocolo de eletroporação através da introdução de genes em células de linfoma de ratos (NEUMANN et al., 1982).

Além disso, já foram realizados estudos com salmão, onde foram avaliadas a integração do DNA exógeno em embriões que foram fecundados a partir de espermatozoides submetidos a eletroporação e também a taxa de captação de DNA pelos espermatozoides (SIN et al., 2000; SYMONDS; WALKER; SIN, 1994). Ainda, na espécie bovina foram executados estudos onde foi testado a capacidade de espermatozoides eletroporados em carrear DNA exógeno para oócitos durante a fertilização bem como o zigoto produzido seguir o desenvolvimento embrionário (GAGN; POTHIER; SIRARD, 1991; RIETH; POTHIER; SIRARD, 2000).

### 5.3.1.6 Sistema CRISPR / Cas

Um grande passo no direcionamento da edição gênica foi a descoberta de moléculas capazes de reconhecer sequências específicas de DNA, possibilitando modificações em locais alvo. O sistema CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) / Cas (Proteínas associadas a CRISPR) é a ferramenta mais eficiente para o direcionamento da edição de genoma dos dias atuais. O sistema foi recentemente descoberto como sistema imune de algumas bactérias e arqueobactérias, como proteção contra vírus e plasmídeos invasores (BARRANGOU, 2007; GARNEAU, 2010; SCHOOK et al., 2016).

CRISPR são pequenas frações presentes no DNA de bactérias compostas por repetições de nucleotídeos. Cada uma dessas regiões localiza-se ligada a um espaçador de DNA (protoespaçador), que é uma região não codificante. A transcrição dos elementos sequência-espaçamento do *locus* da CRISPR gera um RNA não codificante chamado pré-crRNA, que posteriormente será clivado em sequências menores de crRNA (CRISPR RNA). O crRNA será homólogo ao genoma de sequências estranhas. Quando ocorre a invasão há o pareamento do crRNA com a sequência genômica do elemento invasor. Essa ligação direciona a proteína CAS (sendo a CAS9 mais utilizada para edição de forma artificial), a qual possui atividade de endonuclease, que irá clivar o genoma invasor (GARNEAU, 2010; GASIUNAS; SCHOOK et al., 2016).

Para aplicação no direcionamento da edição do genoma, é necessário a presença de um RNA transativado (tracrRNA) capaz de associar-se ao transcrito inicial CRISPR, o crRNA. A associação tracrRNA-crRNA forma uma molécula de RNA de dupla fita que é processada pela RNase e convertida em um RNA guia (sgRNA) direcionadora da nuclease CAS9. Esse mecanismo tem sido utilizado para geração de animais transgênicos *knockin* e *knockout* através da ativação da maquinaria de reparo de DNA por recombinação não homologa. Além disso, o sistema CRISPR/Cas tem sido aplicada a modulação da expressão gênica, sem utilizar a atividade de nucleasse da CAS9, ao ser ligado a moléculas que modulam a expressão de genes (GASIUNAS, 2010; JINEK, 2012; SCHOOK et al., 2016 QI, 2013; WADE, 2015).

#### 5.4 Clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS)

A técnica de TNCS é uma metodologia na qual o núcleo de uma célula adulta é transferida para um oócito enucleado, originando um novo indivíduos geneticamente idêntico ao doador do núcleo (OGURA; INOUE; WAKAYAMA, 2013; REMIÃO, 2012). A TNCS foi primeiramente proposta por SPEEMANN (1938), onde foi utilizada como meio para compreender o papel do material genético na diferenciação celular em anfíbios, ou seja, entender se o núcleo de células diferenciadas teria a competência de dar início e sustentação ao desenvolvimento embrionário.

Com o passar do tempo, trabalhos nessa linha foram sendo aprimorados, na década de 50 foi realizada pioneiramente com êxito a primeira transferência nuclear em anfíbios (sapo-leopardo - *Rana pipiens*) (BRIGGS e KING, 1952), seguido pelos trabalhos de GURDON (1962) e GURDON & UEHLINGER (1966), os quais demonstraram o potencial de reprogramação de células diferenciadas com a utilização de *Xenopus* adultos. Relacionado aos mamíferos, o desenvolvimento da transferência nuclear ocorreu de forma lenta, sendo descrita pela primeira vez em estudos com coelhos (BROMHALL, 1975), mas o êxito só foi alcançado em 1981 onde os pesquisadores ILMENSEE & HOPPE (1981) divulgaram o nascimento de três camundongos clonados.

Após, estudos demonstraram que a clonagem em mamíferos ficaria restrita a utilização de núcleos provenientes de embriões em início do desenvolvimento. No entanto, esses trabalhos foram realizados utilizando zigotos como receptores, o que hoje já se sabe que não oferecem condições necessárias à indução da reprogramação a um estágio inicial de desenvolvimento embrionário (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Mais recentemente, estudos demonstraram que a utilização de oócitos em meiose II são mais apropriados para utilizar em clonagem devido a melhora na reprogramação epigenética em comparação com os demais estágios de desenvolvimento já utilizados (ZOU et al., 2001; LEE et al., 2007). Nesse sentido já foram desenvolvidos estudos utilizando oócitos em meiose II maturados *in vivo* (OHKOSHI et al., 2003) e *in vitro* (ZHOU et al., 2007).

Nos animais domésticos de importância econômica WILLADSEN (1986) conquistou os primeiros resultados com a produção de cordeiros clonados a partir de núcleo de embriões de 8 a 16 células (WILLADSEN; 1986). Após, estudos

confirmaram a repetibilidade da técnica em outras espécies como bovinos (PRATHER et al., 1987) e suínos (PRATHER et al., 1989). A partir desses resultados, foi despertado interesse comercial em aplicar essa metodologia para multiplicação de embriões derivados de animais com alto mérito zootécnico. Assim, grandes investimentos foram aplicados para pesquisas nessa área para o desenvolvimento de novos protocolos (COLLARES, 2005, GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Posteriormente, em 1996, Keith Campbell e colaboradores relataram um marco decisivo na produção de clones através da transferência nuclear, ao utilizarem núcleos de células embrionárias cultivadas *in vitro* por longo período. No ano seguinte, a mesma equipe expôs o nascimento da ovelha Dolly, o primeiro clone produzido a partir do núcleo de células somáticas de um animal adulto (WILMUT et al., 1997). Esse importante passo despertou ainda mais o interesse pelo aprimoramento da técnica, bem como sua aplicação para geração de animais transgênicos. Além do interesse comercial, a TNCS tem sido implementada em pesquisas, com o propósito de compreender os processos envolvidos no controle de diferenciação e envelhecimento, dentre outros mecanismos envolvidos no método (COLLARES, 2005).

Existem etapas necessárias para execução da TNCS; todavia, os protocolos para TNCS variam entre laboratórios (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Os principais passos são: a maturação do oócito receptor, a remoção da cromatina do oócito receptor (enucleação), preparação das células doadoras de núcleo, transferência do núcleo, ativação dos oócitos receptores e cultivo dos embriões reconstituídos (COLLARES, 2005).

As fases do procedimento relacionadas ao oócito compreendem a maturação, a enucleação e a ativação. A qualidade do oócito receptor é muito importante para permitir a reprogramação do núcleo transferido e suportar o desenvolvimento inicial (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). A maturação nuclear até o estágio de meiose II pode ser realizada *in vivo* ou *in vitro*. A técnica de maturação *in vitro* para a TNCS é feita da mesma maneira da maturação *in vitro* de oócitos para utilização na fertilização *in vitro*. *In vivo*, são necessários hormônios para estimular o crescimento de múltiplos folículos. Porém, os custos para o tratamento, os materiais e os equipamentos são uma limitação para produção de um grande número de oócitos *in vivo* (COLLARES, 2005).

A enucleação, na maioria das vezes, é realizada por microaspiração com pipeta. Para essa etapa, é necessária a remoção das células do *cumulus* para

subsequente seleção dos oócitos. A seleção é realizada de acordo com a presença do corpúsculo polar e o aspecto do citoplasma. Após, os oócitos são submetidos à desestabilização do citoesqueleto, normalmente utilizando citocalasina, que proporciona elasticidade durante a micromanipulação (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

A ativação do oócito refere-se à indução da degradação de complexos enzimáticos responsáveis por manter o oócito em metáfase II, compreendendo o início das oscilações intracelulares de cálcio, exocitose de grânulos corticais, a formação dos pró-núcleos, o recrutamento de mRNAs e o início da síntese de DNA; o que irá permitir a finalização do processo meiótico e início do desenvolvimento embrionário (CAMPBELL et al., 2005; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Os oócitos maturados permanecem bloqueados em metáfase II, pela ação do MPF até que haja a fecundação. Durante a fertilização a entrada do espermatozoide acarreta diversas rotas de sinalização que levam a redução da atividade e degradação do MPF, assim, quando ocorre a ativação oocitária e essa redução de MPF há a reconstrução da membrana nuclear, a replicação de DNA e início da divisão celular no embrião (MIYAZAKI et al., 1993; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Baseado nisso, diversos métodos físico-químicos para ativação são utilizados, como por exemplo: etanol, impulsos elétricos, ionóforos dentro outros (CIBELLI et al., 1998; KATO et al., 1998; LIU et al., 1998). Todos esses métodos têm como intuito aumentar o influxo de cálcio no oócito e liberar as reservas de cálcio intracelular. Tais estratégias procuram mimetizar as oscilações dos níveis de cálcio que ocorre naturalmente e são importantes ao desenvolvimento embrionário (MIYAZAKI et al., 1993; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). No entanto, essas técnicas não são muito eficientes e outras metodologias têm sido testadas para aumentar a eficácia da ativação do oócito. Alguns procedimentos já utilizaram inibidores da síntese proteica, da atividade de proteínas quinases ou ainda por inibidores de proteínas quinases dependentes de ciclinas, para evitar a atividade do MPF. Entretanto, ainda não se sabe o efeito da exposição dos embriões reconstituídos a estes agentes inibidores, e ainda são necessárias maiores investigações (SUSKO-PARRISH et al., 1994; KEEFER et al., 2002).

Para preparação das células doadoras de núcleo, são realizados protocolos diferentes de acordo com a origem de cada uma. Quando a transferência é feita a partir de células somáticas a separação das células é realizada por tripsina

(COLLARES, 2005). Geralmente é realizado uma pequena biopsia cutânea de maneira não invasiva para obter o material genético desejado, posteriormente, para sua multiplicação é necessário estabelecer cultivo celular *in vitro*. Como material doador pode ser utilizada uma variedade de tecidos para transferência de células somáticas (KATO, TANI, TSUNODA, 2000; HEYMAN, 2005; ZAKHARTCHENKO, 1999).

Existem dois principais métodos para transferência do núcleo para o oócito receptor (Reconstrução do embrião): microinjeção e fusão de membranas. A microinjeção baseia-se em aspirar a célula doadora de núcleo de forma individual para dentro de uma pipeta com diâmetro inferior ao da célula, o que irá provocar o rompimento da membrana celular. Com a mesma pipeta, o núcleo é injetado dentro do espaço perivitelino do oócito receptor enucleado e através de eletroestimulação é introduzida no citoplasma por meio da fusão da célula somática com citoplasma do oócito; além disso, a eletroestimulação também é importante para início do processo de ativação (HEYMAN, 2005).

A fusão celular pode ser induzida por diversos métodos como utilizando impulsos elétricos (eletrofusão ou eletroporação), lipossomos, polietilenoglicol, dentre outros. Dentre esses, a eletrofusão é a mais utilizada e compreende um pulso de corrente alternada e um pulso de corrente direta. A corrente alternada alinha a célula doadora e o oócito receptor em posição paralela; já a corrente direta, induz a formação de poros nas membranas que leva a fusão entre as células (COLLARES, 2005).

As evidências de que os núcleos de células provenientes de diferentes tecidos somáticos mantêm-se capazes de formar um novo indivíduo despertou grande interesse na aplicação da transferência nuclear em diferentes áreas de pesquisa e para fins comerciais (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Nesse sentido, com o desenvolvimento alcançado, a transferência nuclear pode ser empregada na preservação de espécies ameaçadas de extinção, na geração de animais transgênicos, na propagação de animais com alto valor zootécnico, na produção de células e tecidos para terapia regenerativa, e ainda, em estudos sobre as funções dos genes, doenças genéticas e reprogramação gênica; os quais podem ser aplicados também à saúde humana (COLLARES, 2005; REMIÃO, 2012).

Apesar do grande interesse e empenho no aperfeiçoamento da eficácia da técnica, ainda existem muitos obstáculos a serem superados. O maior problema enfrentado são as anormalidades fisiológicas e funcionais apresentadas pelos clones

como: dificuldade na manutenção da prenhez, no desenvolvimento embrionário e placentário, distúrbios pós-natais. Acredita-se que esses impasses sejam ocasionados devido a reprogramação das marcas epigenéticas da célula somática doadora de núcleo serem ineficientes em comparação a um embrião gerado a partir de fertilização (REMIÃO, 2012).

A produção de clone através de TNCS exige etapas complexas e delicadas. No entanto, a eficiência continua variável e aquém das expectativas. Entretanto, ainda com a baixa eficiência, a utilização dessa tecnologia continua em expansão e suas aplicações são bastante promissoras. Dessa forma, para permitir uma maior e melhor exploração da clonagem, faz-se necessário que os resultados sejam mais replicáveis. Para isso, avanços nesse sentido deverão ser alcançados com o maior esclarecimento dos mecanismos reguladores de diferenciação e reprogramação (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

## **6 Cultivo *in vitro* dos zigotos (CIV)**

O cultivo *in vitro* consiste no período onde os embriões ficarão em cultivo durante seu desenvolvimento desde a fase zigótica, logo após a fertilização, até a fase embrionária em que seja apto para ser vitrificado, transferido para fêmea ou utilizado em pesquisas. Esta etapa possui grande importância na produção *in vitro* de embriões, e para sua execução diversos parâmetros fisiológicos da espécie são avaliados, como o número de folículos ovulados, o tempo de maturação dos oócitos, os eventos da fertilização, o tempo levado para um zigoto chegar ao estágio de blastocisto, bem como os componentes presentes no trato materno durante esse período (KRISHER, 2012).

O meio utilizado deve fornecer condições necessárias para as primeiras clivagens do embrião, para a ativação do seu genoma e para seu consequente desenvolvimento (ALMEIDA, 2014). Meios capazes de favorecer o crescimento embrionário até o estágio de blastocisto começaram a ser desenvolvidos após o maior entendimento dos mecanismos e processos da FIV (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). Durante o período pré-implantacional ocorre eventos significativos como o início e prosseguimento da clivagem, ativação do genoma embrionário,

agregação e compactação de blastômeros, dentre outros importantes fenômenos (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Durante o desenvolvimento embrionário ocorrem alterações metabólicas no embrião e a medida em que ocorre a migração do oviduto para o útero, onde na maioria das espécies, há um alto consumo de glicose, dessa forma a formulação dos meios utilizados devem suportar as necessidades das vias metabólicas auxiliando a produção de ATP para sustentar todas funções celulares (ABSALON-MEDINA; BUTLER; GILBER, 2014). O primeiro trabalho desenvolvido sobre o metabolismo de zigotos durante o desenvolvimento *in vitro* foi realizado por Biggers, Whittingham e Donahue (1967), onde foi demonstrado que zigotos de ratas evoluíam até o estágio de duas células embrionárias na presença de piruvato e lactato. Após, os mesmos pesquisadores seguiram estudando o desenvolvimento de embriões em meios simples, sem adição de substâncias macromoleculares. Com tal procedimento, observaram que em algumas espécies os embriões paravam o desenvolvimento entre duas e dezesseis células. Com o passar do tempo, essa parada foi denominada bloqueio do desenvolvimento embrionário (BIGGERS; WHITTINGHAM; DONAHUE 1967; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008).

Os primeiros estágios da embriogênese são regulados por meio de elementos maternos presentes no oócito, onde o RNA materno e proteínas acumuladas são suficientes para a progressão do embrião. Com o decorrer da evolução do desenvolvimento embrionário, a embriogênese se torna dependente da ativação transcricional do genoma do embrião, tal alteração é marcada por mudanças importantes no padrão de síntese proteica (FREI; SCHULTZ; CHURCH, 1989). Durante o cultivo *in vitro* de embriões, ocorre o bloqueio do desenvolvimento embrionário, durante essa fase de transição de expressão, em resposta aos efeitos adversos ou carências do sistema de produção. Essa deficiência metabólica gera transcrição deficiente do genoma e conseqüentemente, alterações na síntese proteica (TELFORD, 1990; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). Em bovinos e ovinos o bloqueio ocorre no estágio de oito a dezesseis células, em ratos ocorre no período de duas células e coelhos em oito células (CAMOUS, 1984; FREI; SCHULTZ; CHURCH, 1989; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008).

Em 1968 Sreenan e Scanlon relataram a possibilidade do cultivo de embriões bovinos fora do ambiente uterino bovino até a fase de blastocisto. (SREENAN;



SCANLON; GORDON, 1968). No mesmo ano, Adams e colaboradores também obtiveram êxito ao cultivar embriões até o estágio de blastocisto eclodido. Após, foi relatado o cultivo de embriões bovinos em tubas uterinas de diferentes animais. Com esses relatos, foi possível avaliar as propriedades da tuba uterina e também as necessidades dos embriões nesse período inicial de desenvolvimento (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). No entanto, tal metodologia de produção *in vivo* é laboriosa e de alto custo, devido a manutenção de biotérios e processos cirúrgicos para transferência e retirada de embriões da receptora temporária (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

A partir das observações das propriedades das tubas, iniciou-se cocultivo dos embriões com células somáticas de oviduto, granulosa, endometriais, dentre outras. Tais células trazem benefícios ao cultivo, devido a produção de fatores de crescimento e devido a remoção de componentes inibitórios do meio de cultivo (radicais livre, metabólitos celulares e embrionários, entre outros). No entanto, o cocultivo de embriões com outros tipo celulares possui desvantagens como competição por nutrientes com os embriões; e secreções de variados compostos em concentrações diversas as quais nem sempre são possíveis de serem identificados (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). Além disso ainda não foi determinado qual o melhor sistema de cocultivo e quais os melhores tipos de células (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Por isso, nos anos 90, a técnica de cocultivo foi substituída por meio de cultivo. Até os dias atuais o meio mais eficiente parece ser o (SOF), desenvolvido por Tervit e colaboradores. Os pesquisadores se basearam na secreção de no oviduto de ovelhas para produção do meio (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). Atualmente o sistema de cultivo mais empregado utiliza atmosfera com 5% O<sub>2</sub> e um meio simples: meio SOF acrescido de aminoácidos. A tendência é aplicar meios quimicamente definidos baseado nas exigências metabólicas, ambientais e nutricionais do embrião, uma vez que o embrião é uma estrutura totalmente dinâmica e que possui variações em sua necessidade nutricional (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Com relação a algumas condições básicas do ambiente de cultivo embrionário tem sido demonstrado que o piruvato é essencial para a clivagem e posterior desenvolvimento embrionário. Somente após a ativação do genoma os embriões utilizam a glicose como fonte energética. Oócitos bovinos que são maturados e

fecundados *in vitro* podem desenvolver-se até blastocisto em meio simples; sendo necessário apenas a adição de aminoácidos, fosfatos e piruvato, sendo os aminoácidos reguladores de potencial hidrogeniônico (pH), substrato energético e participam da síntese proteica (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

O pH das soluções deve variar entre 7,3 e 7,5 durante a maturação e cultivo embrionário *in vitro*. Dessa forma, é necessário o uso de tampões no meio de cultivo para minimizar as alterações do pH do meio e possíveis alterações no citosol das células devido manipulações inerentes ao processo de PIVE (FUKUI *et al.*, 1991; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Essas alterações podem levar à diminuição da viabilidade embrionária e à diminuição da produção de blastocistos. O tampão mais eficiente utilizado nos protocolos de PIVE é o HEPES, desenvolvido por Good e colaboradores (DOWNS & MASTROPOLO, 1997; GOOD *et al.*, 1966). As importantes propriedades desse tampão incluem: alta solubilidade em água, dificuldade para atravessar membrana plasmática, não formar complexos com substâncias biológicas e não agir como inibidor de ações bioquímicas (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Outro fator importante ao cultivo é a utilização de mistura gasosa, empregada quando o sistema utilizado não é cocultivo com células somáticas e sem adição de soro. Nesses casos utiliza-se atmosfera gasosa contendo 5% de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>. A baixa concentração de oxigênio está associada a um aumento na taxa de desenvolvimento embrionário (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Na prática, após a FIV ou ICSI, os embriões podem ser cultivados em apenas um meio ao longo do tempo de cultivo ou em um sistema sequencial. No sistema sequencial o meio muda a formulação de acordo com período de cultivo. Esses meios procuram mimetizar as alterações fisiológicas que os embriões sofrem *in vivo* (WRENZYCKI, 2016). Um dia após a FIV, as células do cumulus são removidas com sucessivas pipetagens e os zigotos, são lavados. Os oócitos não fecundados e degenerados são removidos (ALMEIDA, 2014). Após, os presumíveis zigotos são passados, em grupos de 20 – 30, para placas previamente preparadas contendo meio SOF. As placas são alocadas em estufas a 39°C, com atmosfera gasosa de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% DE O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>, onde permanecerão por 7 dias (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Durante o período de cultivo, quando é utilizado o meio sequencial, é realizado uma renovação do meio duas vezes, nos dias 3 e 5 da produção, após a FIV. Essas

trocas de meio são chamadas de 1º e 2º *feeding*, respectivamente. Essa prática constitui-se da retirada de 50% do meio da gota de cultivo e adição do mesmo volume de meio novo pré-aquecido. Na realização do 1º *feeding* é feita a contagem de clivagem e são descartadas as células que não clivaram. No segundo *feeding* somente é realizada troca de meio; esse meio, normalmente é acrescido de glicose, para atender às necessidades metabólicas do embrião nessa etapa do desenvolvimento. Terminado o tempo de cultivo, os embriões produzidos serão classificados e deverão ser transferidos para receptoras, criopreservados ou utilizados para análises em setores de pesquisa (ALMEIDA, 2014; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

A avaliação embrionária baseia-se em uma análise visual do embrião e normalmente é realizada utilizando lupa estereomicroscópica. Tal análise requer experiência e atenção do examinador aos detalhes da estrutura; além disso, é importante sempre movimentar o embrião dentro da gota em que se encontra para que haja análise de toda estrutura em diferentes ângulos (BÓ; MAPLETOFT, 2013). O examinador deve levar em consideração em sua avaliação: presença de células mortas e extrusas, a forma regular ou irregular, homogeneidade na cor, presença de vacúolos. É importante ressaltar que existem diversos meios de avaliação, e normalmente se utiliza um padrão recomendado pelo laboratório, mesmo assim, a análise acaba sendo subjetiva e de baixa repetibilidade, podendo o mesmo embrião ser classificado em diferentes graus de qualidade, quando analisados por diferentes examinadores (López-Damián et al., 2008; ROCHA et al, 2016). Nesse sentido, tem se buscado alternativas com o auxílio da tecnologia e da informática, utilizando modelos matemáticos para desenvolvimento de uma classificação mais padronizada, e sem prejuízo as estruturas, como acontece em biópsias embrionárias (ROCHA et al, 2016).

## 7 Considerações finais

A PIVE na espécie bovina é uma técnica amplamente utilizada comercialmente. O Brasil possui posição de destaque mundial dentro do setor de produção *in vitro* de embriões bovinos. Essa atividade ainda estimula o desenvolvimento da economia do país, com o crescimento da produção de animais de alto mérito genético, ampliando o desenvolvimento do setor de corte e leite.

Ainda, a produção *in vitro* de embriões representa excelente oportunidade para manter a produção mundial de alimentos, elucidar funções fisiológicas, auxiliar o tratamento da infertilidade humana e animal. Também, com o auxílio da transgenia e clonagem, é possível auxiliar na recuperação de espécies em risco de extinção e produção de órgãos para xenotransplantes.

Entretanto, os resultados obtidos na PIVE ainda não são ideais, sendo a sua eficiência muito baixa, chegando apenas a 30-35% de produção. Nesse sentido, pesquisas têm sido realizadas, com enfoque em cada uma das etapas envolvidas no processo, na tentativa de tornar essa importante técnica mais eficiente. Tal situação representa uma grande janela de oportunidades de desenvolvimento e expansão aos profissionais da área de biotecnologia reprodutiva.

## Referências

ABSALÓN-MEDINA, V. A.; BUTLER, W. R.; GILBERT, R. O. Preimplantation embryo metabolism and culture systems: experience from domestic animals and clinical implications. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 31, n. 4, p. 393-409, 2014.

ÁGUILA, L. et al. Methyl-  $\beta$  -Cyclodextrin Improves Sperm Capacitation Status Assessed by Flow Cytometry Analysis and Zona Pellucida-Binding Ability of Frozen/Thawed Bovine Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 6, p. 931–938, 2015.

ALMEIDA, Tamie Guibu. **Relatório de Estágio Curricular Supervisionado: Produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2014. 57f. Relatório de Estágio Curricular Supervisionado (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Reprodução Animal) Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

AMIN, A. et al. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 6, p. 497–513, 2014.

AREZZO, F. Sea urchin sperm as a vector of foreign genetic information. **Cell Biology International Reports**, v. 13, n. 4, p. 391-404, 1989.

BARRANGOU, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in

prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709-1712, 2007.

BARRETTO, Letícia Siqueira de Sá. **Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário bovino *in vitro***. 2007. 113f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

BARTON-DAVIS, E.. et al. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 95, n. 26, p. 15603-15607, 1998.

BAVISTER, B. D. Early history of in vitro fertilization. **Reproduction**, v. 124, n. 2, p. 181–196, 2002.

BIGGERS, J. D.; WHITTINGHAM, D. G.; DONAHUE, R. P. The pattern of energy metabolism in the mouse oöcyte and zygote. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 58, n. 2, p. 560-567, 1967.

BIOLOGY4ISC. **Reproduction**. Disponível em: <<http://biology4isc.weebly.com/1-human-reproduction.html>>. Acesso em: 01 dez. 2016

BIOTECHNOLOGY LEARNING HUB. **Fertilisation**. Disponível em: <[http://biotechlearn.org.nz/focus\\_stories/biological\\_control\\_of\\_possums/images/fertilisation](http://biotechlearn.org.nz/focus_stories/biological_control_of_possums/images/fertilisation)>. Acesso em: 01 dez. 2016.

BLONDIN, P. Status of embryo production in the world. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 356–358, 2015.

BO, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Evaluation and classification of bovine embryos. **Anim Reprod**, v. 10, n. 3, p. 344-8, 2013.

BORUSZEWSKA, D. et al. The effect of lysophosphatidic acid during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 13, p. 44, 2015

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2015/2016 a 2025/2026**. Brasília: Mapa/ACS, 2016, p. 51 a 54 e 61 a 71. Disponível em: <  
[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/acs/2016/projecoes-agronegocio-2016-2026.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/acs/2016/projecoes-agronegocio-2016-2026.pdf) >. Acesso em: 2 outubro de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Bovinos e Bubalinos**. Brasília, 201-. Disponível em: <  
<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos> >. Acesso em 2 outubro de 2016.

BRESSAN, Fabiana Fernandes. **Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico**. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Reprodução, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

BRIGGS, R.; KING, T.J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. **Proceedings of National Academic Science**, 38, 455-461,

1952.

BRINSTER, R. et al. Translation of globin messenger RNA by the mouse ovum. **Nature**, v. 283, n. 5746, p. 499, 1980.

BROMHALL, J.D. Nuclear transplantation in the rabbit egg. **Nature**, 258, 719-162, 1975.

CAMARGO, L.S.A. et al. Factors influencing in vitro embryo production. **Animal reproduction**, v. 3, n. 1, p. 19-28, 2006.

CAMOUS, S. et al. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. **Journal of reproduction and fertility**, v. 72, n. 2, p. 479-485, 1984.

CAMPBELL, K. H. S. et al. Cloning: eight years after Dolly. **Repro. D. Anim.**, v. 40, p. 256-268, 2005

CAMPBELL, K.H. et al. Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. **Theriogenology**, v.68, p.14-31, 2007

CAMPOS, Vinicius Farias. **Nanotecnologia aplicada à transgênese animal**. 2011. 76f. Dissertação (Doutorado em Ciências – Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

CANOVAS, S.; GUTIERREZ-ADAN, A. Effect of Exogenous DNA on Bovine Sperm



Functionality Using the Sperm Mediated Gene Transfer (SMGT) Technique. **Molecular reproduction and development**, v. 77, n. 8, p. 687-698, 2010.

CHAVES, R. N. et al. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 34, p. 37–49, 2010.

CHEUQUEMÁN, C. et al. Supplementation of IVF medium with melatonin: Effect on sperm functionality and in vitro produced bovine embryos. **Andrologia**, v. 47, n. 6, p. 604–615, 2015.

CIBELLI, J.B. et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. **Science**, 280, 1256-1258, 1998

COLLARES, Tiago. **Animais transgênicos: princípios e métodos**. 1ªed. São Carlos: Suprema, 2005. 349 p.

DOWNS, S. M.; MASTROPOLO, A.M. Culture conditions affect meiotic regulation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 46, n. 4, p. 551-566, 1997.

FABER, D. C. et al. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 125–138, 2003.

FIGUEIREDO, J. R. DE; GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A. Princípios básicos , importância e desafios das biotécnicas aplicadas à reprodução animal. **Revista CFMV**, p. 20–27, 2008.

FILHO, J. M. P. et al. Produção de embriões bovinos in vivo e in vitro. 84ª SEMANA DO FAZENDEIRO, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2013.

FIGUEIREDO, J. R. DE; GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A. Princípios básicos , importância e desafios das biotécnicas aplicadas à reprodução animal. **Revista CFMV**, p. 20–27, 2008.

FRASER, L. R. The “switching on” of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 3, p. 197–208, 2010.

FREI, R. E.; SCHULTZ, G. A.; CHURCH, R. B. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8–16-cell stage of embryogenesis in the cow. **Journal of reproduction and fertility**, v. 86, n. 2, p. 637-641, 1989.

FUKUI, Y. et al. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. **Journal of reproduction and fertility**, v. 92, n. 1, p. 125-131, 1991.

GAGN, M. B.; POTHIER, F.; SIRARD, M. ElectroPoration of Bovine Spermatozoa to Carry Foreign DNA in Oocytes. **Molecular Reproduction & Development**, n. 1989, 1991.

GALLUPO, Andrea Giannotti. Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos à *Brucella abortus* para o estabelecimento de um modelo experimental em estudos de interações embriões/patógenos. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina

Veterinária) - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005

GARNEAU, J.E. et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. **Nature**, v. 468, n. 7320, p. 67-71, 2010.

GASIUNAS, G. et al. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 39, p. E2579-E2586, 2012.

GEORGADAKI, K. et al. The molecular basis of fertilization (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, n. 4, p. 979–986, 2016

GILBERT, S.F. Developmental biology. 6th ed. Sinauer Associates; Sunderland, MA: 2000

GILCHRIST, R. B. Recent insights into oocyte - follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 23, 2011.

GONÇALVES, P.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. **Biotecnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2a ed. [s.l.] Roca, 2008. 388f.

GOOD, N. E. et al. Hydrogen ion buffers for biological research. **biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 467-477, 1966.

GURDON, John B. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. **Developmental biology**, v. 4, n. 2, p. 256-273, 1962.

GURDON, J.B.; Uehlinger V. "Fertile" [Uehlinger V.](#) intestine nuclei. **Nature**, v. 210, p. 1240-1241, 1966.

HEN, Gideon et al. Gene transfer to chicks using lentiviral vectors administered via the embryonic chorioallantoic membrane. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36531, 2012.

HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 3, p. 353-361, 2005.

HOFMANN, A. et al. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. **EMBO reports**, v. 4, n. 11, p. 1054-1058, 2003.

ICKOWICZ, D.; FINKELSTEIN, M.; BREITBART, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian J. Androl.**, v. 14, n. 6, p. 816–21, 2012.

ILLMENSEE, K.; HOPPE, P. C. Nuclear transplantation in *Mus Musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell**, Cambridge, v. 23, p. 9-18, 1981.

ISHINO, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene

product. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429-5433, 1987.

JAENISCH, R.; MINTZ, B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 71, n. 4, p. 1250-1254, 1974.

JIN, S.; YANG, W.X. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated?. **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p. 3600, 2017.

JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816-821, 2012.

JORDAN, E. T. et al. Optimizing Electroporation Conditions in Primary and Other Difficult-to-Transfect Cells. **Journal of biomolecular techniques: JBT**, v. 19, n. 5, p. 328, 2008.

KATO, Y. et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2095-2098, 1998.

KATO, Y.; TANI, T.; TSUNODA, Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **Journal of reproduction and fertility**, v. 120, n. 2, p. 231-237, 2000.

KEEFER, C.L. et al. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. **Biology of Reproduction**, 66, 199- 203, 2002.

KRISHER, R. L. Utility of animal models for human embryo culture development: domestic species. In: Embryo Culture. **Humana Press**, Totowa, NJ, 2012. p. 27-37

KROPP, J. et al. Invited review: Genetic contributions underlying the development of preimplantation bovine embryos. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 3, p. 1187-1201, 2014.

LAVITRANO, M. et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice. **Cell**, v. 57, n. 5, p. 717-723, 1989

LEE, J. W. et al. Effects of sperm pretreatment and embryo activation methods on the development of bovine embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. **Reproductive Biology**, v. 15, n. 3, p. 154–162, 2015.

LEE, S.H. et al. Cellular composition and viability of cloned bovine embryos using exogene-transfected somatic cells. **Reproduction in Domestic Animal**, 42, 44-52, 2007

LIU, C. et al. Pronuclear microinjection and oviduct transfer procedures for transgenic mouse production. **National Institutes of Health**, p. 1–15, 2013.

LIU, L; JU, J.C.; YANG, X. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. **Molecular reproduction and development**, v. 49, n. 3, p. 298-307, 1998.

LOIS, C.; BROWN, E. J.; BALTIMORE, D. Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. **Science**, v. 295, n. 5556, p. 868-872, 2002.

LÓPEZ-DAMIÁN, E. et al. Assessment of *Bos taurus* embryos comparing stereoscopic microscopy and transmission electron microscopy. **Journal of Cell and Animal Biology**, 2(3), pp.72-78, 2008.

MACHATY, Z.; PEIPPO, J.; PETER, A. Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 937-950, 2012.

MARTINS, C. F.; SILVA, A. E. D. F.; RUMPF, R. Injeção Intracitoplasmática de Células Espermáticas e suas Aplicações na Reprodução dos Bovinos. Embrapa - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -Recursos Genéticos e Biotecnologia**, v. 84, p. 39p., 2002

MCGREW, M. J. et al. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. **EMBO reports**, v. 5, n. 7, p. 728-733, 2004.

MIKICH, A. B. **Oogênese**. 2008. Disponível em <  
<http://www.ufrgs.br/gametaembriao/oogenese.htm>> Acesso em: 20 nov. 2016.

MIKICH, A. B. **Fertilização**. 2008 Disponível em <  
<http://www.ufrgs.br/gametaembriao/interacao.htm>> Acesso em: 20 nov. 2016.

MIYAZAKI, S. et al. Essential role of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor/ Ca<sup>2+</sup>

release channel in Ca<sup>2+</sup> waves and Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization of mammalian eggs. **Developmental Biology**, 158, 62-78, 1993.

MOORE, K.; PERSAUD, T. O Início do Desenvolvimento Humano: Primeira Semana. In: **Embriologia Clínica**. 8a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 16–40.

NEUMANN, E. et al. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **The EMBO journal**, v. 1, n. 7, p. 841-845, 1982.

NEUMANN, E.; ROSENHECK, K. Permeability Changes Induced by Electric Impulses in Vesicular Membranes. **The Journal of membrane biology**, v. 10, n. 1, p. 279-290, 1972.

ODDI, S. et al. DNA uptake in swine sperm: Effect of plasmid topology and methyl-beta-cyclodextrin-mediated cholesterol depletion. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, n. 12, p. 853–860, 2012.

OGURA, A.; INOUE, K.; WAKAYAMA, T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. **Philosophical transaction of the royal society B**, v. 368, n. 1, p. 13–16, 2013

OHKOSHI, K. et al. Caprine somatic cell nuclear transfer using in vivo matured oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. **Animal Science**, 74, 269-276, 2003

PASSOS, L. G. C. et al. Criopreservação de embriões murinos em biotérios. In: **Scielo Books**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. p. 225–245.



PAVÃO, Danielle Labadessa. **Avaliação da citotoxicidade e interferência da Ateleiaglazioviana na interação do Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) com oócitos bovinos maturados in vitro**. 2009. 60f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2009.

PFEIFER, A. et al. Transgenesis by lentiviral vectors : Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 4, p. 2140-2145, 2002.

PRAKASH, S. et al. Morphological diversity of sperm: A mini review. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 12, n. 4, p. 239–242, 2014

PRATHER, R. S. et al. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 37, n. 4, p. 859-866, 1987.

PRATHER, R. S.; SIMS, M. M.; FIRST, N. L. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 3, p. 414-418, 1989.

QI, L. S. et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. **Cell**, v. 152, n. 5, p. 1173-1183, 2013.

REMIÃO, M. H. et al. Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive Toxicology**, v. 63, p. 70–81, 2016.

REMIÃO, Mariana Härter. **Reprogramação celular e produção de embriões por transferência nuclear**. 2009. 60f. TCC (Graduação em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - A review. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 1139–1151, 2003.

RIETH, A.; POTHIER, F.; SIRARD, M. A. Electroporation of Bovine Spermatozoa to Carry DNA Containing Highly Repetitive Sequences Into Oocytes and Detection of Homologous Recombination Events. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, n. 4, p. 338-345, 2000.

ROCHA, J. C. et al. Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard?. **JBRA assisted reproduction**, v. 20, n. 3, p. 150, 2016.

RUFINO, F. A. Printed in Brazil DETERMINAÇÃO DO SEXO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO : UMA REVISÃO DE MÉTODOS COM ÊNFASE PARA A PCR ( Sexing of in vitro produced bovine embryos : A review of methods with emphasis on PCR ). **Archives of Veterinary Science**, v. 11, p. 1–7, 2006.

SALICIONI, A. M. et al. Signalling pathways involved in sperm capacitation. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 65, p. 245, 2007.

SANTANA, P. P. B. et al. Addition of L-arginine to the fertilization medium enhances subsequent bovine embryo development rates. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1132–1138, 2016.

SCHOOK, L. B. et al. Emerging technologies to create inducible and genetically defined porcine cancer models. **Frontiers in Genetics**, v. 7, n. FEB, p. 1–7, 2016.

SEIDEL, G. E. Lessons from reproductive technology research. **Annual review of animal biosciences**, v. 3, n. November 2014, p. 467–87, 2015.

SIN, F. Y. T. et al. Electroporation of salmon sperm for gene transfer: efficiency, reliability, and fate of transgene. **Molecular reproduction and development**, v. 56, n. S2, p. 285-288, 2000.

SMITH, K.; SPADAFORA, C. Sperm-mediated gene transfer : applications and implications. p. 551–562, 2005.

SOSA, M. A. G.; DE GASPERI, R.; ELDER, G. A. Animal transgenesis: An overview. **Brain Structure and Function**, v. 214, n. 2–3, p. 91–109, 2010.

SQUIRES, E. L. Maturation and fertilization of equine oocytes. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 31-45, 1996.

SREENAN, J.; SCANLON, P.; GORDON, I. Culture of fertilized cattle eggs. **The Journal of Agricultural Science**, v. 70, n. 2, p. 183-185, 1968.

SUSKO-PARRISH, J.L. et al. Inhibition of protein kinases after an induced calcium

transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. **Developmental Biology**, 16, 729-739, 1994.

SYMONDS, J. E.; WALKER, S. P.; SIN, F. Y. T. Electroporation of salmon sperm with plasmid DNA : evidence of enhanced sperm / DNA association. **Aquaculture**, v. 119, n. 4, p. 313-327, 1994.

SZÖLLÖSI, D. et al. In vitro maturation of sheep ovarian oocytes. **Reproduction Nutrition Développement**, v. 28, n. 4B, p. 1047-1080, 1988.

TAN, W. S. et al. Precision Editing of Large Animal Genomes. **Advances in Genetics**, v. 80, n. October, p. 37–97, 2012.

TANG, L.; GONZALES, R.; DOBRINSK, I. Germline modification of domestic animals. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 93–104, 2015.

TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular reproduction and development**, v. 26, n. 1, p. 90-100, 1990.

TIAN, X.; et al. Beneficial Effects of Melatonin on Bovine Oocytes Maturation: A Mechanistic Approach. **Journal of Pineal Research** 57 (3): 239–47.  
doi:10.1111/jpi.12163.

UGAJIN, T. et al. The shape of the sperm midpiece in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection relates sperm centrosomal

function. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 27, n. 2-3, p. 75-81, 2010.

VARAGO, F. C.; MENDOÇA, L.; LAGARES, M. A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 100–109, 2008.

VIANA, J.H.M; FIGUEIREDO, A.C.S. Mercado de embriões - Estatísticas da Produção e Transferência de Embriões em 2013 e os Novos Rumos da Indústria de Embriões no Brasil. **Jornal O Embrião (SBTE)**. 55.ed. 1º semestre 2015. 36p.

VIGNEAULT, C. Transcription Factor Expression Patterns in Bovine In Vitro-Derived Embryos Prior to Maternal-Zygotic Transition. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1701–1709, 2004.

WADE, M. High-throughput silencing using the CRISPR-Cas9 system: a review of the benefits and challenges. **Journal of biomolecular screening**, v. 20, n. 8, p. 1027-1039, 2015.

WALL, R. J.; POWELL, A. M.; PAAPE, M. J.; KERR, D. E.; BANNERMAN, D. D.; PURSEL, V. G.; WELLS, K. D.; TALBOT, N.; HAWK, H. W. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. **Nature Biotechnology**, v.23, p.445-451, 2005

WEBB, R.; BURATINI, J. Desafios globais para o século XXI: o papel e a estratégia do setor agropecuário. In: **Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, Brasil**. Foz do Iguaçu, Brasil: [s.n.]. p. 36–45, 2016.

WHEELER, M. B.; BLECK, G. T.; DONOVAN, S. M. Transgenic alteration of sow milk to improve piglet growth and health. **Reproduction Suppl**, v.58, p.313-324, 2001.

WILLADSEN, S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, v. 320, n. 6057, p. 63-65, 1986.

WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v.385, p.810-813, 1997

WRENZYCKI, C. Sistemas de cultivo in vitro: quão longe estamos das condições ideais? In: **Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, Brasil**. Foz do Iguaçu, Brasil: [s.n.]. p. 155–159. 2016.

WU, B.; ZAN, L. Enhance beef cattle improvement by embryo biotechnologies. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 5, p. 865–871, 2011.

ZAKHARTCHENKO, V. et al. Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. **Molecular reproduction and development**, v. 54, n. 3, p. 264-272, 1999.

ZAMBRANO, F. et al. Improved preimplantation development of bovine ICSI embryos generated with spermatozoa pretreated with membrane-destabilizing agents lysolecithin and Triton X-100. **Theriogenology**, p. 1–9, 2016.

ZHOU, H.; LIU, C.; WANG, W. Heterospecific nuclear-transferred embryos derived from equine fibroblast cells and enucleated bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animal**, 42, 243-247, 2007

ZHU, T. **In Vitro Fertilization**, 2009. (Nota técnica).

ZHU, T. **In Vitro Fertilization**. Embryo Project Encyclopedia. Disponível em: <  
<http://embryo.asu.edu/handle/10776/1665> > Acesso em: 02 out. 2016.

ZOU, X. et al. Production of cloned goats from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei or fused with cumulus cells. **Cloning**, 3, 31-37, 2001.