

BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO



ANA CARLA COSTA CAVALCANTE
KLAYTO JOSÉ GONÇALVES DOS SANTOS

UTILIZANDO AS
BIOTECNOLOGIAS DA
REPRODUÇÃO

ANA CARLA COSTA CAVALCANTE
KLAYTO JOSÉ GONÇALVES DOS SANTOS



ANA CARLA COSTA CAVALCANTE
KLAYTO JOSÉ GONÇALVES DOS SANTOS

ÍNDICE

Introdução	5
Fundamentos da reprodução	7
Ciclo reprodutivo e hormônios	10
Inseminação artificial (IA)	12
Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)	14
Criopreservação	18
Produção In Vitro de embriões	21
Transferência intrafolicular ovócitos imaturos (TIFOI)	29
Superovulação (SOV)	29
Clonagem	30
Considerações finais	31



1. INTRODUÇÃO

O que são Biotecnologias da Reprodução?

As biotecnologias da reprodução são um conjunto de técnicas que tem o objetivo de auxiliar, melhorar ou modificar aspectos reprodutivos, visando melhoramento genético, tratamento de doenças, como a infertilidade, conservação de espécies, otimização da utilização de animais, aumento da produtividade, seleção de características desejáveis, entre outros.

Importância e Aplicações na Reprodução Animal

Com o passar dos anos e o crescimento exponencial da população mundial, a demanda de carne, leite e seus derivados têm sido fruto de discussões, assim como a busca por formas de produzir com mais segurança, qualidade e sustentabilidade. Por meio das biotecnologias aplicadas à reprodução se tem conseguido avançar a passos largos, seja pela otimização da utilização de um touro, realizando a criopreservação de sêmen, por Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) que permite a manipulação do ciclo estral da fêmea, ou tantas outras biotecnologias, como: IA convencional, produção *in vitro* de embriões e clonagem.

Objetivo

O objetivo deste ebook é demonstrar as principais biotecnologias utilizadas atualmente e suas aplicações no campo.

2. Fundamentos da Reprodução

2.1 Anatomia e Fisiologia Reprodutiva

O sistema reprodutivo da fêmea bovina é composto por vulva, vagina, útero, tubas uterinas e ovários, que possuem suas especificidades morfológicas e funcionais. Conhecer as funções e características do sistema é muito importante para identificar possíveis distúrbios que podem afetar a concepção, o desenvolvimento do embrião e o parto.



Adaptado de Feitosa (2014).

2.2 Vulva

A vulva é a parte final do sistema reprodutivo, um órgão externo formado pelo clitórís, lábios vulvares e glândulas. O clitórís é uma estrutura flexível, que possui terminações nervosas e sensoriais. Os lábios vulvares são divididos em maiores e menores e se diferenciam pela localização e tecido de formação. Os lábios maiores possuem glândulas sebáceas e tubulares, com uma fina camada de tecido muscular. Os lábios menores são formados por tecido esponjoso (Pansani 2013).

2.EVagina

A vagina é o local onde ocorre a cópula e é o canal de nascimento e expulsão da placenta, é formada uma camada muscular e outra serosa,, seu lúmen diminui ao longo da porção cranial formando o fôrnice vaginal (Hafez & Hafez, 2004).



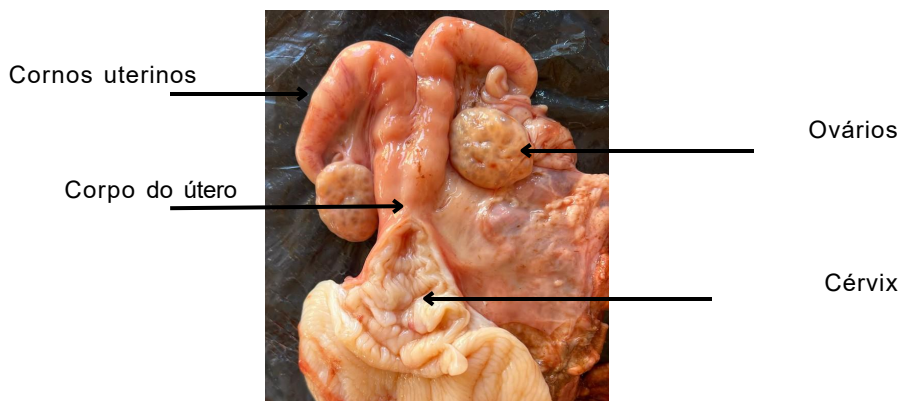
Fonte: Arquivo pessoal

2.4Útero

O útero é composto por dois cornos, corpo do útero e a cérvix, seu tamanho é variável a depender da idade da fêmea, gestações, número de partos e fase do ciclo estral (Arthur & Santos, 1979). As camadas do útero são divididas em três, endométrio, miométrio e perimétrio, os ruminantes apresentam no endométrio estruturas denominadas carúnculas que são responsáveis por fixar a placenta no período em que a fêmea está gestante (König & Liebich, 2011). A gestação acontece em um dos cornos uterinos, local onde ocorre a implantação do embrião e posterior desenvolvimento. A cérvix é a estrutura responsável por separar o útero da vagina, é composta por anéis, estruturas musculares com fibras elásticas, somente no momento do parto ou cio ela se encontra dilatada e com produção de muco, que acontece por meio das células presentes no local (König & Liebich, 2011).

2.5 Tubas uterinas

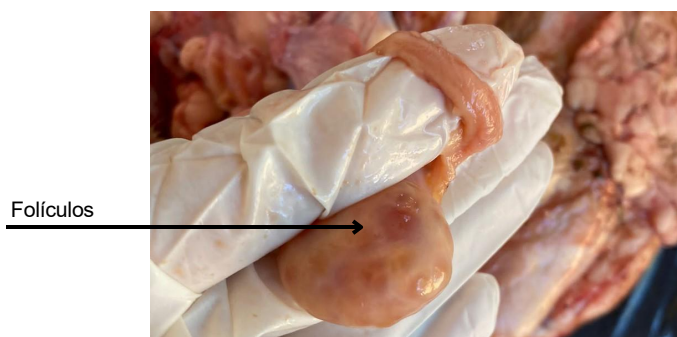
De formato tubular, são estruturas pares responsáveis pela captação dos oócitos, divididos em três estruturas com funções distintas. Infundíbulo, local onde estão as fímbrias responsáveis pela apreensão do oócito após a ovulação, ampola é o local onde ocorre a fertilização, e o istmo responsável por levar os espermatozoides até a ampola por meio de contrações (Ball & Peters, 2006).



Fonte: Arquivo pessoal

2.6 Ovários

As fêmeas bovinas apresentam ovários com formato elíptico, podendo ocorrer variações em seu tamanho e formato a depender da fase do ciclo estral. Os ovários desempenham função endócrina e exócrina. A função endócrina se dá pela produção hormonal, por meio da esteroidogênese, e a exócrina pela produção do gameta, o oócito. A parte interna do ovário é denominada estroma, local onde estão vasos e inervações, já a superfície do ovário onde estão os folículos e demais estruturas é denominada parênquima (König & Liebich, 2011).



Fonte: Arquivo pessoal

3. Ciclo Reprodutivo e Hormônios

Ferreira (2010) relata que o ciclo estral é um conjunto de acontecimentos fisiológicos que geram modificações neuroendócrinas que afetam o sistema genital e o comportamento da fêmea bovina. Nessa espécie ele possui duração média de 21 dias de intervalo, e é dividido em 4 fases: proestro; estro; metaestro e diestro (REECE, 2017).

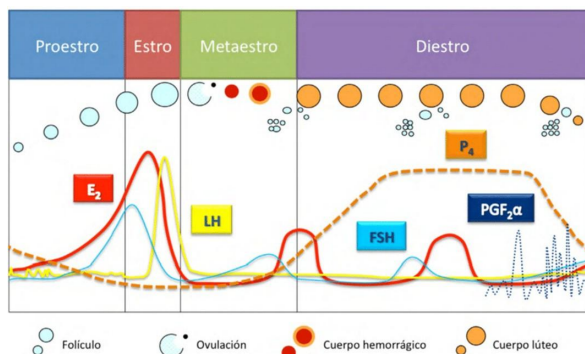
O proestro e estro integram a fase folicular (4-6 dias), ou seja momento de ação do hormônio estrógeno, já a metaestro e diestro compreendem a fase lútea (14-18 dias) onde o efeito hormonal maior é causado pela ação da progesterona (Ball & Peters, 2006).

O proestro é caracterizado pelo déficit de progesterona, uma vez que ocorre a lise do corpo lúteo, tem duração de 2 a 3 dias e possui aumento dos níveis séricos de estradiol devido o desenvolvimento folicular, elevada liberação de GnRH e gonadotrofinas (LH e FSH), (Grunert et al., 2005).

Com o aumento das concentrações de estrógeno a fêmea bovina entra no período denominado estro, é o estágio com maior manifestações comportamentais, onde a fêmea apresenta receptividade sexual, hiperatividade, vulva edemaciada, e muco vaginal (Dirksen et al., 2013).

O metaestro é o estágio seguinte, a ovulação ocorre cerca de 12 horas após manifestação do estro, as células do folículo que sofreu ovulação são reorganizadas e o corpo lúteo é formado, estrutura responsável pela produção de progesterona (Grunert et al., 2005)

Soares e Junqueira (2019) relatam que o diestro abrange o maior período do ciclo estral, aproximadamente 12 dias, sendo este estágio caracterizado pela intensa atividade do corpo lúteo, que secreta alta concentração de progesterona, com o objetivo de manutenção da gestação.



Fonte: Rangel, 2018.

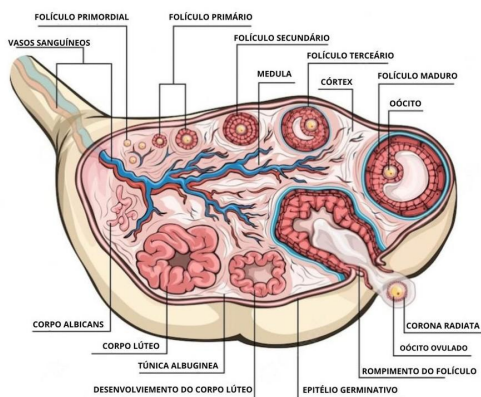
3.1 Dinâmica folicular

O desenvolvimento folicular ocorre principalmente por vias endócrinas, onde os folículos passam por estágios de desenvolvimento crescente, estático e regressão (ADAMS et al., 2008). O crescimento folicular em bovinos acontece em duas ou 3 ondas, onde um grupo de pequenos folículos são recrutados e sofrem ação do hormônio folículo estimulante (FSH), quando os folículos atingem tamanho superior a 5 mm passam a produzir e secretar estradiol e inibina que reduzem a liberação de FSH (MELLO et al., 2014, DRIANCOURT et al., 2001). Segundo AERTS et al., (2010) com a seleção do folículo dominante os demais se tornam atresícos e regredem, momento definido como divergência de dominância folicular (GINTHER et al., 1989).

O crescimento final do folículo ocorre pela queda das concentrações de progesterona e aumento do LH, o folículo libera grandes concentrações de Estradiol (E2) que desencadeia a liberação de GnRH e consequentemente produz picos de LH, resultando na ovulação (BARUSELLI et al., HAFEZ, 2004).

Para Marinho (2021), após o pico de LH e consequente ovulação, há a formação do corpo lúteo (CL), sendo o LH responsável por estimular a luteinização das células da teca e da granulosa do folículo pré-ovulatório. Dentre as funções do CL está a manutenção da gestação, redução da secreção de gonadotrofinas e prevenção da ocorrência de estro comportamental (FORDE et al., 2011).

Caso não ocorra o reconhecimento materno da gestação (16° dias do ciclo estral), ocorre a luteólise, por meio da ação da ocitocina em receptores do útero que promovem a liberação de prostaglandina (PGF2 α), dando início a um novo ciclo (FORDE et al., 2011).



Fonte: Leonardo Ballardin.

4. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

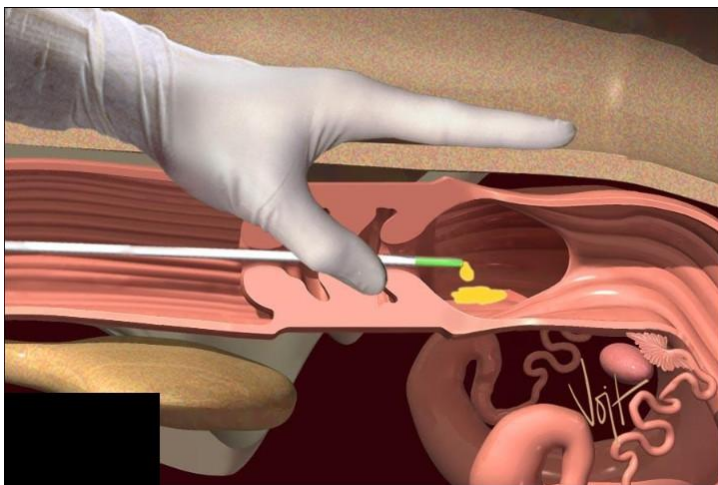
1. História e Evolução da Inseminação Artificial

As primeiras evidências da inseminação artificial remetem-se aos árabes, no ano de 1332, quando um chefe de uma tribo introduziu algodão no trato reprodutivo de uma égua e conseguiu obter parte do ejaculado de um garanhão de uma tribo rival, depositando-o posteriormente na vagina de uma égua que estava no cio (WEBB, 1992). Em 1779, o italiano Lazzaro Spallanzani, da Universidade de Pavia, Itália, foi o primeiro cientista a realizar uma inseminação artificial em mamíferos (SILVA, 2002).

Em 1900 realizou-se a primeira inseminação artificial bem sucedida em bovinos, na Rússia e na Dinamarca (IVANOFF, 1922; PERRY, 1945). No Brasil, o primeiro experimento de inseminação artificial em bovinos bem sucedido ocorreu em 1977 em Cacequi-RS pelo professor da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Antônio Mies Filho (SILVA, 2023).

2. Métodos e Técnicas

A técnica consiste na deposição mecânica do sêmen no corpo do útero da fêmea (SENAR, 2011) com o auxílio de um aplicador de sêmen e a manipulação manual da cérvix via transretal.



Fonte: Rural Gestão Pecuária e Genética Bovina (2018)

Para o sucesso desta técnica é necessário realizar a detecção de cio. O principal sinal do cio é quando a vaca aceita a monta de um touro, rufião ou de outra vaca do rebanho. Alguns outros sinais como inquietação, vulva “avermelhada” e edemaciada também podem ser observados.

Em condições ideais, a inseminação artificial é realizada entre 8 e 12 horas após o animal aceitar a monta. Em geral, adota-se a regra de cio observado pela manhã, inseminação à tarde, e cio observado à tarde, inseminação na manhã seguinte (CAMPOS et al., 2012)



Dentre os materiais necessários estão:

- Aplicador de sêmen;
- Bateria de inseminação;
- Luva de palpação retal;
- Cortador de palhetas;
- Botijão de sêmen;
- Descongelador ou caixa de isopor;
- Termômetro.



4.3 Vantagens e desvantagens

As principais vantagens da inseminação artificial incluem:

- Utilização do sêmen de touros geneticamente superiores;
- Acelera o ganho genético;
- Evita a transmissão de doenças venéreas;
- Permite o melhor controle do rebanho;
- Aumenta a uniformidade dos bezerros produzidos;

Porém, os custos e a mão de obra adequada são desafios recorrentes no campo.



Fonte: Arquivo pessoal

5. Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)

1. - Conceito e Aplicações

Sendo a biotecnologia mais utilizada atualmente no Brasil e no mundo, a técnica de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) vem avançando cada vez mais e se tornando a preferência de milhões de pecuaristas no Brasil. A utilização da técnica de IATF permite a inseminação de um grande número de animais em um menor período de tempo, esse método induz a ovulação nas vacas, o que possibilita que o processo seja agendado para uma data e horário específicos.

A aplicação da técnica de IATF oferece inúmeras vantagens aos pecuaristas, aprimorando significativamente o sistema de produção. Uma das principais vantagens desse método é a redução da mão de obra, pois otimiza o tempo necessário para a inseminação em larga escala. Além disso, a IATF contribui para o avanço genético da propriedade, permitindo a seleção criteriosa de matrizes e sêmen de alta qualidade, o que eleva continuamente o padrão genético do rebanho.

5.2 Protocolo e Sincronização

O protocolo de sincronização reprodutiva, tem duração entre 9 a 11 dias, é essencial para alinhar as ondas foliculares e sincronizar a ovulação das matrizes. A decisão sobre quais hormônios utilizar e em quais dias aplicá-los depende de uma análise criteriosa de vários fatores, incluindo as condições de manejo na propriedade e os objetivos da sincronização.

Entre os hormônios mais frequentemente utilizados estão os progestágenos e seus análogos sintéticos. Estes hormônios são geralmente administrados através de implantes, que são dispositivos projetados para liberar as substâncias de forma controlada e gradual, garantindo uma manutenção eficaz dos níveis hormonais desejados. A liberação gradual desses hormônios é crucial para imitar os padrões naturais e garantir uma sincronização precisa.

Para melhorar a eficiência dos programas de sincronização reprodutiva utilizando progesterona e prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$), é necessário sincronizar tanto o crescimento folicular quanto a regressão do corpo lúteo, utilizando também estrógenos e GnRH (Pursley, Mee & Wiltbank, 1995). Mesquita (2009) destaca que alguns programas incluem gonadotrofina coriônica equina (eCG), que possui atividade predominante de FSH, e gonadotrofina coriônica humana (hCG), com atividade predominante de LH, conforme o período do ciclo estral.

A prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) é o fármaco mais utilizado na sincronização do cio. No entanto, a apresentação do estro após o tratamento pode levar até seis dias, dependendo da responsividade do corpo lúteo e do estágio de desenvolvimento do folículo dominante (Mesquita, 2009). O uso de progesterona ou progestágenos permite não apenas a sincronização de estro em fêmeas ciclando, mas também a indução da retomada da ciclicidade em vacas em anestro.

Os principais hormônios utilizados e suas funções:

- GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas): Hormônio produzido pelo hipotálamo, tem como principal função induzir o pico pré-ovulatório de LH e a ovulação de um folículo maduro ou sua luteinização.
- FSH (Hormônio Folículo Estimulante): Produzido pela hipófise e secretado em resposta ao GnRH, o FSH tem como principal função o desenvolvimento folicular. Além disso, ele produz estrógeno nos folículos, produz inibina na fase final de maturação dos folículos e aumenta os receptores para LH nos folículos.
- Progesterona: hormônio que imita a função do corpo lúteo, inibindo a liberação de LH e bloqueando a ovulação enquanto são administrados.
- Estrógenos: sais conjugados de estradiol, como valerato, benzoato e cipionato, exercem ação luteolítica. Quando administrados ao término de um tratamento com progestágenos, em um período de baixa concentração de progesterona, estimulam, por feedback positivo, a secreção de GnRH, que provoca o pico pré-ovulatório de LH e, conseqüentemente, induz a ovulação.
- Prostaglandina: tem a função de induzir a luteólise e, conseqüentemente, a queda na produção de progesterona para que um novo ciclo se inicie.
- ECG (Gonadotrofina Coriônica Equina): atua de forma semelhante ao FSH, embora também possa se ligar aos receptores de LH, promovendo o crescimento e a maturação final do folículo dominante e estimulando a produção de estradiol. Além disso, favorece uma luteinização mais eficaz do folículo ovulado.

Sobre os protocolos com progestágenos, os dispositivos de progesterona são mantidos na vagina por 7 a 10 dias, com a administração de benzoato de estradiol (BE) no momento da inserção. Após a retirada do dispositivo, é aplicada prostaglandina (PGF2 α) e, após 24 horas, uma nova dose de BE. A inseminação (IATF) ocorre entre 52 a 56 horas após a remoção do dispositivo. O dispositivo simula a fase lútea, e sua retirada favorece a maturação folicular. Para garantir a ovulação sincronizada, recomenda-se a administração de BE ou GnRH próximo à remoção do implante. Implantes com progestágenos são usados para inibir a ovulação ou o desenvolvimento do corpo lúteo, permanecendo no local por 9 dias para evitar folículos persistentes. Estradiol ou GnRH ajudam a promover a ovulação ou a atresia folicular, além de induzirem a regressão do corpo lúteo.

5.3 Benefícios e Desafios

Dentre os diversos benefícios da IATF já citados acima, destacam-se:

- Inseminação de matrizes a partir de 60 dias após o parto;
- Melhor controle reprodutivo das matrizes, permitindo a eliminação das improdutivas;
- Possibilidade de altas taxas de prenhez no início da estação de monta;
- Redução da quantidade de touros de repasse na propriedade;
- Padronização dos lotes de bezerros.

No entanto, para obter bons resultados com a técnica de IATF, diversos desafios devem ser enfrentados, como:

- Implantação de instalações adequadas para um bom manejo, evitando estresse nos animais;
- Controle sanitário eficiente;
- Médico veterinário capacitado para elaborar um protocolo eficiente para a propriedade;
- Alto investimento inicial para a implantação da técnica;
- O intervalo entre as inseminações pode ser maior, pois a técnica só pode ser repetida após confirmação de que a fêmea bovina não está gestante.



Fonte: Arquivo pessoal

6. Criopreservação

A manutenção de células em baixas temperaturas tem sido uma técnica eficiente de armazenamento e formação de bancos genéticos, células somáticas, espermatozoides, oócitos e embriões. A utilização de nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ em botijões criogênicos permite além de estocagem segura, transporte e rápido acesso.

6.1 Criopreservação de sêmen

A criopreservação de sêmen envolve várias etapas que antecedem a congelação propriamente dita. Primeiramente realiza-se a colheita do sêmen via eletroejaculação, massagem das glândulas sexuais acessórias ou vagina artificial. As avaliações iniciais mimetizam o exame andrológico e correspondem a motilidade (0-100%), turbilhonamento (1-5) e vigor (1-5). Ainda, a morfologia e concentração espermática são consideradas análises essenciais, sendo a última realizada para a correta diluição do sêmen antes do envase. Deste modo, a próxima fase compreende a adição hipertônica de um agente crioprotetor permeável (ACP), envase, resfriamento e aquecimento (WOODS et al., 2004).

A primeira diluição inicia-se após a retirada da quantia para as avaliações do sêmen, em que será feita a diluição de 1 para 1, ou seja, o mesmo volume de ejaculado e o de diluente. Em seguida, é feita a diluição final baseado na concentração espermática (SILVA et al., 2017). Os diluidores são compostos principalmente por substâncias denominadas crioprotetores, os quais são divididos em intracelulares (penetrante) e extracelulares (não penetrantes) e tem como principal função proteger o espermatozoide durante a fase de desidratação celular que ocorre na criopreservação.

Os principais diluidores utilizados para sêmen bovino são formulados à base de gema de ovo ou leite, glicina, ou açúcares como crioprotetores extracelulares. Já a classe de crioprotetores penetrantes tem como principal exemplo o glicerol. Após a correta diluição, inicia-se o envase, mecânico ou manual, por sucção. Nesta fase, o sêmen diluído preenche a palheta de sêmen de 0,5 ou 0,25 ml. Posterior ao envase inicia-se o resfriamento das palhetas.

O resfriamento é composto por duas etapas divididas em curva positiva, onde a queda da temperatura se estende até 5°C; e curva negativa, onde a temperatura decai até -196°C. Entre as duas etapas inclui-se a estabilização por no mínimo 2 horas em uma temperatura de 5°C. Atualmente, o resfriamento pode ser realizado pelo método automático, com a aplicabilidade de máquinas ou pelo método convencional.

O aparelho TK 3000 é exemplo de um modelo programático portátil utilizado na criopreservação de sêmen de mamíferos. Nesta, a curva de resfriamento é de 0,25 °C/min, com duração de 1 hora e 20 minutos e permanece a 5°C por mais 2 horas para a estabilização. A curva de congelamento/negativa é de -20°C/min até alcançar -120°C, posteriormente, as palhetas são imersas em nitrogênio líquido (-196°C) (ABUD et al., 2014).

Na criopreservação pelo método convencional, as amostras podem ser mantidas sob refrigeração a 5 °C por quatro horas. Posteriormente, as amostras são submetidas a uma pré-congelação por 20 minutos, na qual as palhetas são mantidas horizontalmente a uma distância de cinco centímetros da lâmina de nitrogênio líquido e, em seguida, submersas no nitrogênio e armazenadas no botijão criogênico (ABUD et al., 2014).

O processo de criopreservação se finaliza com o aquecimento do sêmen ou descongelação para que as palhetas sejam utilizadas na rotina reprodutiva como por exemplo na inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e na produção *in vitro* de embriões. Nesta etapa, a palheta é adicionada por 30 segundos em um descongelador ou caixa de isopor com água aquecida a 37°C.



6.2 Criopreservação de embriões

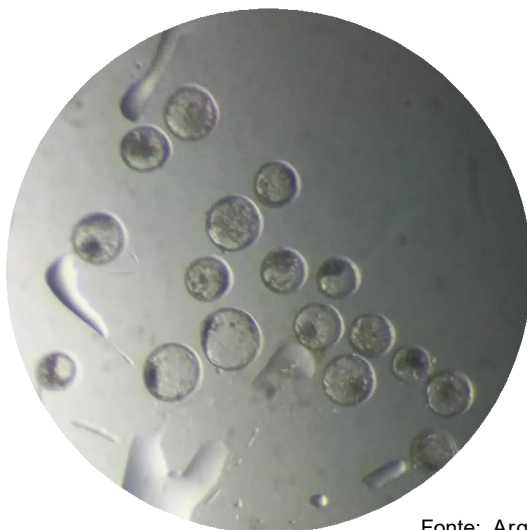
A criopreservação de embriões, assim como dos espermatozoides depende da utilização de crioprotetores, atualmente existem duas técnicas estabelecidas que possuem diferentes processos.

A vitrificação é uma técnica considerada rápida e com menos custos, por não depender de equipamentos de alto valor. No entanto é dependente de técnico treinado. Para manipulação e armazenamento dos embriões, foram descritos diversos itens, com o objetivo de reduzir a quantidade de meio e levar a um resfriamento ultra rápido.

Em meio as técnicas de vitrificação, a OPS criada por Vajta et al. (1998) é a mais utilizada. A OPS é uma palheta convencional de sêmen com diâmetro reduzido em uma extremidade, fazendo com que o armazenamento seja por capilaridade, com isso a quantidade de meio fica entre 1 a 2 μL . Para utilização desse embrião é necessário realizar o reaquecimento, utilizando lupa e placa aquecedora, para só depois ser envasado e transferido (VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

A congelação tradicional ou lenta é realizada em equipamento específico e demanda um maior tempo de trabalho, os embriões são envasados e destinados juntos, nesse caso eles podem ser aquecidos no campo, de forma semelhante a uma palheta de sêmen.

Para esse processo os embriões são colocados em contato com soluções de desidratação e crioprotetores por até 10 minutos, são envasados em palhetas de 0,25 ml e destinados a equipamento programável de congelação. No equipamento a queda da temperatura é controlada, e quando chegam a -32°C devem ser submergidas em nitrogênio líquido (VAJTA; NAGY, 2006).



Fonte: Arquivo pessoal

7. Produção In Vitro de embriões

O primeiro bezerro de FIV nasceu no ano de 1982, proveniente de oócito já ovulado e maturado *in vivo*, somente em 1987 houve o nascimento de gêmeos produzidos sob condições totalmente artificiais (GONÇALVES et al., 2002). No Brasil, segundo Melo et al. a técnica começou a ser utilizada em 1990 após um projeto realizado por meio de parceria entre empresas, em 1994 nasceram os primeiros bezerros de oócitos maturados *in vitro*, utilizando sêmen congelado e o cultivo celular.

Com o desenvolvimento das técnicas e a utilização em escala comercial, em 2014 o Brasil foi considerado o maior produtor de embriões in vitro, com 70% da produção mundial (IETS.,2014).

A produção *in vitro* de embriões é uma das biotecnologias mais utilizadas no momento atual, sua consolidação ocorreu devido a diversas pesquisas na área. A produção do embrião é dependente de algumas etapas que possuem características e tempos diferentes. Desde a obtenção do oócito até o embrião produzido, ocorrem alguns processos, obtenção dos oócitos, maturação (MIV), fertilização (FIV), cultivo (CIV), e por fim a transferência do embrião para uma receptora apta ou seu armazenamento por meio de vitrificação ou congelação.



7.1 Métodos de obtenção de oócitos

De acordo com Varago et al.(2008) a principal técnica utilizada para obtenção de oócitos é a aspiração folicular guiada por ultrassom- OPU (*Ovum pick-up*), que pode ser utilizada a cada 15 dias e em fêmeas gestantes. Existem outros métodos como laparoscopia ou laparotomia via flanco, laparoscopia vaginal, ou *post mortem*. A utilização de ovários provenientes de abatedouros (*post mortem*) em pesquisas é uma das alternativas para o desenvolvimento de novas técnicas e aprimoramento das existentes, considerando a grande disponibilidade (ARMSTRONG et al., 1997).

Para obtenção de oócitos *post mortem*, os ovários são recolhidos e logo em seguida são armazenados em PBS aquecido à 37°C, antes da aspiração devem ser lavados e continuam armazenados em banho maria com mesma temperatura, os folículos entre 2 e 8mm são visualizados e aspirados com auxílio da bomba de vácuo ou agulha e seringa (Barbosa 2024). Em casos de óbitos de fêmeas de alto valor genético ou para o máximo aproveitamento, pode-se optar para além da aspiração, utilização da técnica slicing ou fatiamento, permitindo uma maior recuperação de oócitos por ovário (Deus, 2017).

Os fatores quantitativos e qualitativos dos oócitos podem ser afetados por diversos fatores, como idade da doadora, nutrição, clima, técnica empregada e experiência do Médico Veterinário (DODE & RODOVALHO, 2001). No geral, considera-se que as fêmeas zebuínas produzem maior quantidade de oócitos que as taurinas (Freitas, 2023).



Fonte: Arquivo pessoal

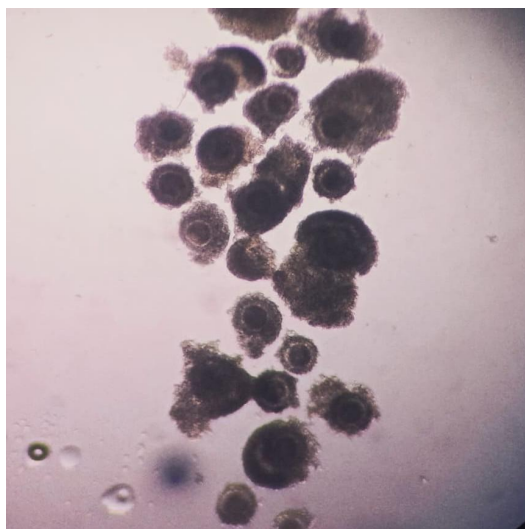
7.2 Seleção de oócitos

Com a obtenção do líquido folicular, o conteúdo é lavado e observado em estereomicroscópio para identificação das estruturas e posterior classificação, a qualidade dos oócitos tem grande impacto na produção dos embriões, após aspiração eles devem ser classificados (GONÇALVES et al., 2002).

Para Gonçalves et al. (2002) a classificação se dá da seguinte forma: Qualidade 1: Apresenta-se com CCOs envoltas em mais de três camadas, com citoplasma homogêneo, com granulações finais, preenchendo completamente o interior da zona pelúcida (ZP) e de coloração marrom. Qualidade 2: As CCOs encontram-se parcialmente compactadas, em menos de três camadas celulares.

O citoplasma é com granulações distribuídas de maneira heterogênea, podendo estar mais concentradas em determinados locais, também preenche completamente a ZP. Qualidade 3: As CCOs demonstram-se presentes, porém expandidas. O ooplasma fica contraído, degenerado, vacuolizado ou fragmentado, preenchendo irregularmente a ZP. Qualidade 4: Ausência de CCOs apresentando-se desnudo.

Os CCOs (células do cumulus oophorus), representam um papel significativo na maturação oocitária nuclear e citoplasmática, na fertilização e na proteção do oócito (PALMA, 2008).



Fonte: Arquivo pessoal

7.3 Maturação oocitária

Zuccotti et al., 2011 esclarece que as oogônias de mamíferos possuem seu desenvolvimento interrompido no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica, até que uma onda de hormônio luteinizante (LH) leve a retomada da meiose em oócitos primordiais com receptores presentes.

A maturação oocitária é adquirida a partir das mudanças foliculares e no complexo *cumulus*-oócito, que acontecem por interferência da onda pré-ovulatória de gonadotrofinas, e levam o oócito a fase de metáfase II (SIRARD. M., 2016).

A competência oocitária é adquirida por alterações nucleares e citoplasmáticas, e envolvem diversos processos, incluindo a retomada da meiose, condensação da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração do núcleo (Kubeba et al. 1988). Com as modificações ocorridas e o primeiro corpúsculo polar extruso, o oócito sofre uma estagnação e metáfase II, que só passará pela conclusão da meiose quando for fertilizado (Gordon, 1994).

No laboratório, considera-se um tempo de maturação em placa de 18 a 24h (Wehrend e Meinecke 2001), em meios que possuem em sua composição uma base de Tissue Culture Medium (TCM), com os demais componentes em concentrações próximas a do sangue, que incluem: lactato, piruvato, vitaminas, aminoácidos, antibióticos, e principalmente hormônios, como hormônio luteinizante (LH) e hormônio foliculo estimulante (FSH), (Gonçalves et al. 2002; Mingoti, 2005; Gonçalves et al., 2007).

A utilização de suplementos de origem animal, com Albumina Sérica Bovina (BSA) e Soro Fetal Bovino (SFB), apresentam bons resultados, no entanto não permitem a definição e a quantificação dos componentes dos mesmos, como aminoácidos, fatores de crescimento e proteína, uma vez que ocorre grande variação entre os lotes (McKiernan et al. 1992).



Fonte: Arquivo pessoal

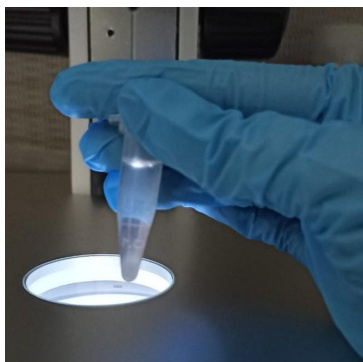
7.4 Fertilização In Vitro

Por meio de pesquisas utilizando animais marinhos e coelhos foi identificado que os espermatozoides precisam passar por um processo denominado capacitação espermática (Austin, 1951; Chang, 1951). No plasma seminal existem fatores que interferem na capacidade de fertilização do espermatozoide, para que ele se torne capaz é necessário alterações bioquímicas, enzimáticas e acrossômicas, para isso são utilizados meios com agentes capacitantes (Florman e First, 1988).

Gordon (1994) identificou um dos agentes capacitantes presentes no trato reprodutivo da fêmea durante o estro, a Heparina. Esse glicosaminoglicano induz modificações na membrana plasmática da célula (Bavister, 2002).

Para o processo de fecundação *in vitro*, os laboratórios costumam usar sêmen congelado visto a grande disponibilidade e facilidade de armazenamento. Para separação dos espermatozoides viáveis existem duas técnicas principais, o gradiente *Percoll* e “*swin up*”, o *Percoll* é um meio com partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona que normalmente é preparado em duas fases (90 e 45%), para separação das células viáveis dos demais componentes é utilizado a centrifuga com rotação e tempo pré-definidos (Gonçalves et al., 2002; Galli e Lazzari, 1996).

Cada touro utilizado no processo de FIV, deve ser avaliado anteriormente em relação a concentração e motilidade, para que a dose utilizada seja suficiente para todos oócitos presentes na gota, é importante ressaltar variações entre sêmen sexado e convencional, no entanto no geral utiliza-se 2x10⁶ espermatozoides/ml (Gonçalves et al., 2002). O meio utilizado em gotas de FIV, possui uma base de Tyrode-albumina-lactato-piruvato (TALP), e as células devem ficar entre 18 e 22h, com temperatura, umidade e atmosfera controladas (Mingoti, 2005).



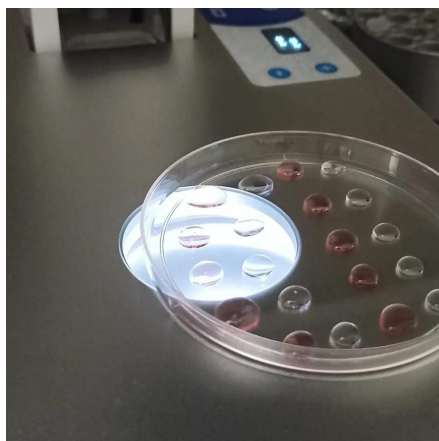
Fonte: Arquivo pessoal

7.5 Cultivo In Vitro

O cultivo é a etapa de maior duração na produção de embriões, da mesma forma que os outros processos, as placas contendo os meios e os possíveis zigotos devem ser mantidas em incubadora, Mingoti et al., (2005), recomendando 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ e umidade saturada a 39°C, já outros autores sugerem 5% de CO₂ e 38,5 °C, em alta tensão de oxigênio.

Uma das principais bases para os meios de cultivo embrionário é o TCM-199 (Tissue Culture Medium), que não possui proteína animal em sua composição (Pinyopummintr e Bavister 1991). No entanto, o Synthetic Oviductal Fluid (SOF) desenvolvido por Tervit et al. (1972) foi o responsável por apresentar os melhores resultados, em muitos casos os meios são suplementados com SFB e BSA.

O cultivo tem duração de 7 dias após a fecundação, durante esse período acontecem as primeiras divisões mitóticas denominadas clivagem, que acontecem sucessivamente até formação da mórula e posteriormente do Blastocisto. (Yanagimachi, 1994).



Fonte: Arquivo pessoal

7.6 Classificação dos embriões

A classificação dos embriões é uma etapa importante e diversos fatores devem ser considerados, como: vacuolização, células extrusas, fragmentação, alterações de coloração, ausência de compactação, zona pelúcida com presença de falhas, todos esses fatores podem interferir no reconhecimento da gestação e desenvolvimento do embrião (IETS, 1998).



Mórula- entre 5,5 e 6 dias do ciclo, blastômeros evidentes.



Mórula compacta- entre 6 e 6,5 dias do ciclo, células compactadas, retração do embrião em relação a zona pelúcida.



Blastocisto inicial- entre 6,5 e 7 dias do ciclo, gradiente osmótico causa a formação da cavidade denominada blastocele.



Blastocisto- entre 7 e 7,5 dias do ciclo, blastocele torna-se maior que a massa celular interna.



Blastocisto expandido- entre 7,5 e 8 dias do ciclo, expansão da blastocele causa aumento de tamanho do embrião e progressiva redução da espessura da zona pelúcida.



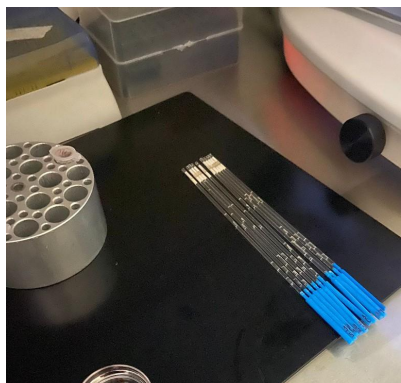
Blastocisto eclodido- ocorre o rompimento da zona pelúcida e o embrião fica em contato com os tecidos maternos.

7.7 Transferência de embriões

A preparação da receptora para receber um embrião produzido *in vitro*, consiste na utilização de protocolo hormonal semelhante ao realizado em programas de IATF (capítulo...). A técnica denominada inovulação, consiste no depósito do embrião no corno uterino ipsilateral ao ovário que o CL está presente, ou seja somente após 7 dias da ovulação, a receptora se encontra apta para receber o embrião.

Os embriões são envasados em palhetas semelhantes às utilizadas no sêmen e devem conter divisões entre meio e ar para que a deposição do embrião ocorra corretamente. O transporte do laboratório a fazenda é realizado em uma transportadora com temperatura constante de 38.5 °C.

Para que a receptora se encontre apta, um CL deve estar presente em um dos ovários, no momento da avaliação seu tamanho deve ser classificado, com uma pontuação de 1 a 3.



Fonte: Arquivo pessoal

8. TIFOI- Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos

SPRICIGO et al., 2016, relata que a utilização dessa técnica pode custar 2 a 3 vezes menos que as demais, e um dos fatores é a não utilização do FSH. Essa técnica precisa de 3 classes diferentes de animais, doadoras, ovuladoras e receptoras. A retirada dos ovócitos imaturos, maiores que 10 mm ocorre por aspiração folicular, são implantados em um folículo dominante da fêmea ovuladora, que é inseminada e após 8 dias é recuperado por meio da lavagem uterina e transferido ou vitrificado (BARBOSA, 2018.-)

9. SOV- Superovulação

A superovulação de doadoras é uma das técnicas que permite o desenvolvimento de embriões produzidos *in vivo*, para isso além das características genéticas, deve-se avaliar a anatomia do trato reprodutivo da fêmea e o funcionamento geral (OLIVEIRA et al., 2014). A alimentação, mineralização e ausência de doenças infecciosas também devem ser rigorosamente verificada (DOMINGUES, 2001).

Segundo Melo et al., (2023) os protocolos para superovulação tem como base a utilização de eCG (gonadotrofina coriônica equina) em dosagem única ou FSH (hormônio folículo estimulante) em 8 doses decrescentes, No entanto para utilização do FSH é necessário a observação do cio, por esse motivo a utilização de P4 (progesterona) e E2 (estrógeno) para iniciar uma nova onda folicular têm se mostrado com resultados mais efetivos (PENITENTE FILHO et al., 2014).

Com a ovulação de vários folículos pode-se programar a inseminação artificial, que deve utilizar algumas doses e ser realizada mais de uma vez.

Para recuperação dos embriões produzidos é realizada a lavagem dos cornos, que deve acontecer entre 6 e 8 dias após a primeira inseminação, os embriões recuperados são avaliados e destinados a criopreservação ou transferência (OLIVEIRA et al., 2014).

10. Clonagem

Sinhá et al. (2019), define a clonagem como um processo de criação de réplicas geneticamente idênticas de uma célula ou organismo. Na área da bovinocultura, o interesse consiste na replicação de animais com características desejáveis de produção, adaptação, resistência, entre outros (BORDIGNON, 2017).

O primeiro animal fruto de clonagem foi a ovelha Dolly, aconteceu por meio da utilização do núcleo de células somáticas da glândula mamária de uma ovelha para oócitos enucleados, experimento realizado por Wilmut et al. (1997). A técnica utilizada foi definida como transferência nuclear de célula somática (TNCS).

Outra técnica utilizada é a partição embrionária, no entanto Vajta e Gjerris (2006) descrevem dificuldades, por somente ser possível criar dois ou no máximo quatro embriões, apesar de ser uma divisão simples, consistindo em partir o embrião ao meio.

Técnica convencional x Handmade Cloning

- Aspiração do corpúsculo polar e citoplasma adjacente com material genético por meio de micromanipulação;
- Utilização de fluorocromo para verificar presença DNA;
- Cultivo dos fibroblastos;
- Inserção da célula doadora de núcleo sobre a zona pelúcida do oócito;
- P r o c e s s o d e f u s ã o ;
- Cultivo.
- Oócitos maturados e desnudos tem a zona pelúcida removida;
- Oócitos sem ZP são bipartidos;
- Coloração de Hoechst 33343;
- Junção de dois hemi-oócitos a uma célula somática por fitohemaglutinina;
- Eletrofusão
- Cultivo.

Fonte: Adaptado de Benvenuti, 2020)

A técnica convencional depende da utilização de micromanipuladores, fator que aumenta significativamente o custo de utilização e precisa de uma equipe especializada. Chavette e Palmer et al., 2014 relatam as dificuldades encontradas principalmente das fases fetais e pós-natais de animais clonados, os resultados de sucesso são de 6 a 15% em relação aos embriões transferidos.

Considerações finais

As biotecnologias da reprodução animal têm revolucionado a pecuária, promovendo avanços significativos na eficiência produtiva e na melhoria genética dos rebanhos. Técnicas como a inseminação artificial, a transferência de embriões e a clonagem permitem não apenas aumentar a taxa de reprodução, mas também acelerar a disseminação de características desejáveis, como resistência a doenças e maior produtividade.

Essas tecnologias também contribuem para a sustentabilidade da produção animal, otimizando recursos e reduzindo o impacto ambiental. No entanto, sua implementação requer conhecimento técnico e práticas éticas, garantindo o bem-estar animal e a aceitação social.

Assim, o investimento em biotecnologias reprodutivas é essencial para enfrentar os desafios do setor, como a demanda crescente por alimentos e as mudanças climáticas, proporcionando um futuro mais eficiente e responsável para a produção animal.

Referências

ABUD, Cátia Oliveira Guimarães et al. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. *Ciência Animal Brasileira*, v. 15, p. 32-37, 2014.

ANDRADE, F. et al. Anatomofisiologia do ciclo estral de fêmeas bovinas. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1140664/1/ultrassonografica-cap1.pdf>.

ARMSTRONG, D.T.; KOTARAS, P.J.; EARL, C.R. Avanços na produção de embriões in vitro a partir de oócitos juvenis e pré-púberes de bezerros e cordeiros. *Reprodução, Fertilidade e Desenvolvimento*, v. 9, n. 3, pág. 333-340, 1997.

AUSTIN, C. R. A 'capacitação' do espermatozoide de mamíferos. *Natureza*, v. 170, n. 4321, p. 326-326, 1952.

BAVISTER, Barry D. Early history of in vitro fertilization. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, v. 124, n. 2, p. 181-196, 2002.

BARBOSA, Andressa Jalyne de Sousa. Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI): revisão de literatura. 2018.

Ball, P. J. H. & Peters, A. R. (2006). *Reprodução em bovinos*. São Paulo, São Paulo, Brasil: Roca.

BORDIGNON, V. Animal cloning – state of the art and applications. *Reference Module in Life Sciences*. Montreal, Canada, p. 1-17, 2017.

BROGNI, Cláudio Francisco. Utilização de ECG e FSH em protocolos de superovulação em bovinos. In: *MANEJO, NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO ANIMAL: TÓPICOS ATUAIS EM PESQUISA*. Editora Científica Digital, 2023. p. 110-116.

CHAVATTE-PALMER, P. et al. Pregnancy and neonatal care of SCNT animals. In: CIBELLI, J. et al. *Principles of Cloning*. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 107-122.

Referências

DE CAMPOS, Oriel Fajardo; DE MIRANDA, João Eustáquio Cabral. Gado de leite: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília, DF: Embrapa; Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012.

DEUS, Alzira Regina Silva de. Influência do soro fetal bovino em diferentes meios durante o resfriamento de ovários sobre os parâmetros quantiquantitativos de oócitos bovinos. 2017.

DIRKSEN, G., GRÜNDER, H. D. & STÖBER, M. (2013). Exame Clínico dos Bovinos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. Theriogenology, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, 2001.

FERREIRA, A. de M. Reprodução da fêmea bovina: fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos). Juiz de Fora: Minas Gerais–Brasil, p. 422, 2010.

Forde et al. (2011). The Role of the Endometrium in Early Pregnancy Loss in Cattle. Journal: Reproduction in Domestic Animals. Volume: 46. Issue: 1 Pages: 17-24. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2010.01728.

FREITAS, Bruno Gonzalez de et al. Effect of Sincrogest injetavel® (injectable progesterone) at different timepoints on fixed time embryo transfer (FTET) success in beef cows. Animal Reproduction, v. 20, n. 2, p. 1, 2023.

FREITAS, Vanessa Paiva. Fatores que afetam a perda de gestação de embriões bovinos de corte produzidos in vitro. 2023.

FLORMAN, Harvey M.; FIRST, Neal L. The regulation of acrosomal exocytosis: I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. Developmental biology, v. 128, n. 2, p. 453-463, 1988.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. Animal Reproduction Science, v. 42, n. 1-4, p. 371-379, 1996.

Referências

GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R. FREITAS, V. J. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. 1. ed. São Paulo: Varela, 2008. p. 261-291.

Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CABI International, 1994, 640p.

GRUNERT, E., BIRGEL, E. H. & VALE, W. G. (2005). Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia: Varela.

Hafez, B. & Hafez, E. (2004). Reprodução Animal (Vol. 1, pp. 513): Manole: São Paulo, Brasil.

IETS. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. Embryo Transfer Newsletter, v. 32 (4) p. 14-26, 2014.

IVANOFF, E. I. On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. The Journal of Agricultural Science, v. 12, n. 3, p. 244-256, 1922.

KUBELKA, Michal et al. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. Biology of reproduction, v. 62, n. 2, p. 292-302, 2000.

König, H. E. & Liebich, H.-G. (2011). Anatomia dos Animais Domésticos: Artmed Editora.

MCKIERNAN, S.H.; BAVISTER, B.D. Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate in vitro development of hamster embryos. In Vitro Cellular and Developmental Biology, v.28, p.154-156, 1992.

MELLO et al. Utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em protocolos de sincronização da ovulação para IATF em bovinos: revisão. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.38, n.3 p.129-134, 2014.

Referências

MARINHO, J. P., & MENDES, L. M. (2021). Influência da Nutrição sobre a Reprodução em Bovinos de Corte: Uma Revisão. *Jornal: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Volume: 73 Pages: 789-798. DOI: 10.1590/1678-4162-11022.

MESQUITA, S.B. A importância da IATF para a Pecuária Brasileira. *Eficiência Reprodutiva*, São Paulo, n. 7, ano. 2, p. 4-8, mar/abr. 2009.

MINGOTI, G. V. Aspectos técnicos da produção in vitro de embriões bovinos. In: I Simpósio tópicos avançados em Biotecnologias da Reprodução, 30/09 a 02/10/2005. UNESP, Campus de Jaboticabal, s/p.

OLIVEIRA, Ana Carolina et al. USO DE LH OU eCG NO ÚLTIMO DIA DE TRATAMENTO SUPERESTIMULATÓRIO. *Revista Campo Digital*, v. 9, n. 2, 2014.

OLIVEIRA, Fabrício Albani et al. ESTRADIOL AND GNRH ON OVULATION INDUCTION FOR ESTRUS SYNCHRONIZED CROSSBRED COWS¹. *Revista Caatinga*, v. 33, n. 3, p. 815-823, 2020.

OLIVEIRA, J.C.; REIS, A.C. Biotécnicas da Reprodução. [s.l: s.n.]. Disponível em: https://www.sabiia.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1097394/1/Biotecnicas_reproducao.pdf. Acesso em: 10 set. 2024.

PEREIRA, A. E. et al. Fertilização in vitro de bovinos: aspectos técnicos e atualizações. *Ciência Animal Brasileira*, v. 20, p. 312-322, 2019.

PERTILE, M. et al. Efeitos de diferentes concentrações de Albumina Bovina (BSA) sobre o desenvolvimento de embriões de bovinos. In: *Simpósio de Biotecnologia da Reprodução*, 2021. UFMT. p. 21-29.

PEREIRA, G. et al. Programas de sincronização de cio e inseminação artificial em bovinos: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 2, p. 98-106, 2010.

Referências

RIOS, C. et al. The effects of different concentrations of bovine serum albumin on embryo development in vitro. *Animal Reproduction Science*, v. 142, n. 1-2, p. 23-30, 2013.

RODRIGUES, A. S. et al. Otimização do manejo de transferência de embriões bovinos produzidos in vitro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 50, n. 7, p. 673-680, 2015.

SÁ, L. et al. Condições de armazenamento e utilização de sêmen bovino em programas de inseminação artificial. In: *Simpósio Nacional de Reprodução Animal*, 2014. Anais... Brasília: Embrapa, 2014. p. 157-162.

SILVA, A. T. et al. Aspectos econômicos e produtivos da reprodução assistida em bovinos leiteiros. In: *SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE REPRODUÇÃO ANIMAL*, 2016. Anais... Brasília: Embrapa, 2016. p. 95-105.

TAVARES, T. C. & CARDOSO, R. M. A importância da manipulação embrionária na reprodução bovina. In: SILVA, J. (Org.). *Biotecnologia na Produção Animal*. Viçosa: Editora UFV, 2012. p. 87-104.

VAN SOEST, P. J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Corvallis, Oregon: Oregon State University Press, 1994.

VAJTA, G. Tips and tricks in vitrification of embryos. In: *ICAR 2020+ 2 SATELLITE MEETING ON CAMELID REPRODUCTION*. p. 4.

VILAS BOAS, R. et al. Reproductive Technologies in Bovine: A Review of Current Applications and Perspectives. *Theriogenology*, v. 107, p. 28-37, 2023.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro dos Colégios Tecnológicos do Estado de Goiás (COTEC), Universidade Federal de Goiás (UFG), Centro de Educação, Trabalho e Tecnologia (CETT) da UFG, Fundação Rádio e Televisão Educativa e Cultural (FRTVE), em parceria com a Secretaria de Estado da Retomada (SER) e Governo do Estado de Goiás, através do Convênio no 01/2021 - SER (Processo no.202119222000153) por meio do Edital de Pesquisa COTEC/CETT/SER No 01/2022.