

PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS

BUENO, Ataliba Perina;

Aluno de Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça – FAMED

BELTRAN, Maria Paula;

Professora da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça – FAMED

RESUMO

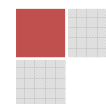
A produção in vitro de embriões (PIV), tem sido usada comercialmente por algumas empresas, com resultados razoáveis. O principal objetivo da PIV comercial visa à obtenção de embriões viáveis de fêmeas que não estão mais aptas a produzirem descendentes pelas técnicas convencionais, como em vacas doadoras que apresentem infertilidade provocada pelo tratamento com gonadotrofinas ou por distúrbios patológico do aparelho reprodutor feminino. Fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes até o terceiro mês e mesmo pós-parto (2 a 3 semanas) podem ser usadas como doadoras para a PIV. Outra vantagem da aspiração folicular guiada por ultra-sonografia na PIV está no fato de que não é necessário o uso de hormônios para a recuperação de oócitos. Apesar destas vantagens, estudos relacionados à maturação oocitária, cultivo embrionário e criopreservação são ainda necessários visando à maximização desta técnica e a produção de embriões de boa qualidade. Isto é de suma importância para a diminuição dos custos da PIV, tomando-a mais acessível aos produtores. O objetivo desse trabalho é descrever a técnica e as principais etapas da produção in vitro de embriões bovinos.

Palavras chave: fertilização in vitro, bovino, aspiração transvaginal guiada por ultra-sonografia

Tema central: Medicina Veterinária

ABSTRACT

The production of embryos in vitro (PIV), has been used commercially for some companies with reasonable results. The primary purpose of IVP commercial seeks to obtain viable embryos of females who are no longer able to produce offspring by conventional techniques, such as donor cows showing infertility caused by treatment with gonadotrophin or by pathological disorders of the reproductive female. Females from six months of age, pregnant women up to the third month, and even post-partum (2 to 3 weeks) can be used as donors for the IVP. Another advantage of follicular aspiration guided by ultrasound in PIV is in the fact that it is not necessary the use of hormones for the recovery of oocytes. Despite these advantages, studies related to the maturation oocitária, culture and embryo cryopreservation are still seeking the necessary technical and maximising the production of embryos of good quality. This is of paramount importance to the reduction of the costs of IVP, taking it more



accessible to producers. The goal of this work is to describe the technique and the main steps of the production of embryos in vitro cattle.

Keywords: in vitro fertilization, veal, aspiration guided by transvaginal ultrasound

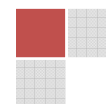
1. INTRODUÇÃO

A produção comercial de embriões bovinos in vitro no Brasil teve início no ano de 1998 com um projeto de inovação tecnológica financiado parcialmente pela Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelas Empresas Beabisa Agricultura Ltda e Gertec Tecnologia de Embriões (GALLI, 2003).

O aprimoramento dos sistemas envolvidos no processo de produção in vitro (PIV) de embriões na espécie bovina a partir de oócitos recuperados de folículos de ovários de vacas abatidas tem sido fundamentais para o estudo e compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante este período, desde a maturação dos oócitos, o processo de capacitação espermática e fertilização, até o início do desenvolvimento embrionário em fase de pré-implantação (HOSHI, 2003). A obtenção de oócitos de animais vivos, mediante a técnica de laparoscopia e mais recentemente, por meio da aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-sonografia, tornou possível a aplicação da técnica de PIV in vivo visando aumentar o aproveitamento do potencial genético das fêmeas consideradas superiores (NAGAI, 2001). O aprimoramento das condições de cultivo in vitro bem como das técnicas de recuperação de oócitos in vivo tornou viável a aplicação da PIV em escala comercial, sendo importante seu desenvolvimento dentro do atual contexto de incremento da produtividade na pecuária e pesquisa de novas biotecnologias (SANGILD, 2000).

2. CONTEÚDO

Em bovinos, além do uso em estudos relacionados à compreensão dos eventos biológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário inicial, a PIV tem sido usada como um método alternativo ou em complementação a TE, com o uso de oócitos imaturos recuperados de ovários de doadoras de várias idades e estado fisiológico-reprodutivo distintos (YOUNG, 1998). Após a recuperação dos oócitos, três passos biológicos que ocorrem in vivo são realizados em laboratório para a

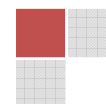


produção de embriões: maturação in vitro (MIV) dos oócitos, fertilização in vitro (FIV) e cultivo in vitro (CIV) (THOMPSON, 2000).

Para a produção in vitro de embriões, uma das técnicas mais utilizadas para a recuperação de oócitos é a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (RODRIGUES, 2000). Com o auxílio de um ultra-som e um transdutor acoplado a um guia-de-aspiração, realiza-se a aspiração mediante introdução de uma agulha no interior dos folículos ovarianos (AVELINO, 2002). Um sistema de bomba a vácuo permite a recuperação dos oócitos e do líquido folicular para um tubo coletor (GALLI, 1996). Realiza-se em seguida a procura e seleção dos oócitos, em microscópio estereoscópico, de acordo com o número de camadas de células do cumulus e o aspecto do citoplasma do oócito (NAGAI, 2001). Os oócitos selecionados são então transportados até o laboratório para que se tenha início o processo de produção in vitro de embriões (SANGILD, 2000).

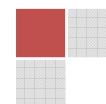
A aspiração folicular, em geral, não promove danos ao sistema reprodutor feminino, embora em alguns casos já tenha sido relatada a predominância de tecido conjuntivo no parênquima ovariano em algumas vacas doadoras que estavam sendo submetidas a sessões de aspiração quinzenais (THOMPSON, 2000).

Ao contrário da transferência de embriões, a aspiração folicular é considerada uma técnica que apresenta maior flexibilidade, uma vez que pode-se obter oócitos de fêmeas a partir dos 6 meses de idade vacas prenhes até o terceiro mês de gestação entre 2 a 3 semanas após o parto (GALLI et al., 1996). A periodicidade pode variar desde a realização de sessões de aspiração de forma esporádica em intervalos de duas semanas, durante várias semanas ou meses (NAGAI, 2001). Outra vantagem da realização da aspiração folicular em comparação a TE está ligado ao fato de que não é necessários o tratamento das doadoras com gonadotrofinas, o que é considerado benéfico especialmente em novilhas jovens, pois a estimulação hormonal pode provocar edema mamário e síndrome de ovário cístico (YOUNG et al., 1998). Além da possibilidade de levar a casos de infertilidade, a superovulação, feita repetidas vezes, pode provocar ainda relaxamento dos ligamentos do úbere (AVELINO, 2002).



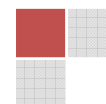
Uma vez que os oócitos foram aspirados do interior dos folículos ovarianos, os mesmos ainda não encontram-se aptos a serem fecundados, sendo necessário uma série de transformações do núcleo e do citoplasma, que consiste na maturação oocitária (GALLI et al., 2003). Em condições in vivo, a maturação tem início logo após o pico pré-ovulatório de LH enquanto que no caso da aspiração folicular, este processo se inicia com a remoção do oócito do interior do folículo ovariano (HOSHI, 2003). Entre 18 a 22 horas são necessárias para que ocorra a maturação nuclear em bovinos, passando do estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estágio de metáfase II (THOMPSON et al., 2000). As modificações citoplasmáticas estão relacionadas à reorganização das organelas citoplasmáticas, migração dos grânulos corticais e a alterações significativas dos padrões de síntese protéica, sendo que a transcrição de genes só voltará a ocorrer após a transição materno-zigótica (YOUNG, 1998). Além disso, ocorrem modificações nas células somáticas que envolvem o oócito durante o processo de maturação, atribuindo-se a estas células funções importantes na maturação nuclear e citoplasmática do oócito bem como na passagem de nutrientes e proteínas reguladoras através das junções tipo gap (NAGAI et al., 2001).

Para que todos os eventos da maturação oocitária ocorram in vitro, é necessário que os meios utilizados durante este período mimetizem as condições encontradas durante o processo de maturação in vivo (SANGILD, 2000). Existem vários métodos diferentes que podem ser utilizados e que já foram testados durante a maturação in vitro (MIV) em bovinos, sendo que a grande maioria dos laboratórios tem optado pela suplementação do meio de maturação com soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas (FSH, LH e estradiol) em condições controladas de atmosfera gasosa e temperatura (RODRIGUES et al., 2000). Sabe-se que o potencial de desenvolvimento dos oócitos pós-maturação pode ser afetado por uma série de fatores, como osmolaridade, temperatura, pH, tensão de CO₂ e O₂, e uso do soro e células somáticas (SANGILD, 2000). Após o tempo de incubação da MIV, os oócitos completam a maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e estando prontos para a fecundação (AVELINO et al., 2002).



No processo de fertilização in vitro, são usados espermatozóides de palhetas de sêmen congelado e o sistema baseado na separação pelo gradiente Percoll tem sido o método mais comum para a obtenção da fração espermática viva após a descongelação (GALLI, 1996). Embora outros sistemas possam ser usados, como o swim-up. Para se maximizar a capacidade fecundante de um sêmen com o mínimo de polispermia possível, testes com diferentes concentrações espermáticas podem ser feitos, fixando-se os oócitos após a incubação com os espermatozóides e analisando-se em microscópio a configuração da cromatina (HOSHI, 2003). A partir destes resultados, se determina a concentração de espermatozóides ideais para cada touro (THOMPSON et al., 2000). Em geral, a concentração usada para a fertilização in vitro é de 2×10^6 espermatozóides / ml, calculada de acordo com a motilidade e concentração da fração viva de espermatozóides obtida após a centrifugação em gradiente Percoll (YOUNG, 1998). O período de incubação dos oócitos com os espermatozóides varia entre 12 a 20 horas.

O cultivo in vitro corresponde à etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto (SANGILD et al., 2000). É durante este período de desenvolvimento pré-implantação que ocorrem eventos como ativação do genoma embrionário, processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula, início da diferenciação embrionária com a formação da blastocelule (HOSHI, 2003). Assim como nas outras etapas anteriores ao cultivo in vitro, diferentes protocolos têm sido usados durante esta fase de desenvolvimento embrionário (GALLI, 1996). As condições de cultivo in vitro são consideradas muito importantes para que bons índices de produção de embriões sejam alcançados, razão pela qual inúmeras pesquisas tem sido realizadas visando avaliar o efeito que diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos, possam exercer sobre o metabolismo e capacidade de desenvolvimento destes embriões, como por exemplo a composição dos meios de cultivo e condições de temperatura e atmosfera gasosa, a adição de aminoácidos, vitaminas, macromoléculas e fatores de crescimento, assim como o uso de soro (NAGAI, 2001). O co-cultivo com células do oviduto ou sobre monocamadas de células diferenciadas, como BRL ou células VERO tem sido usadas com êxito em alguns laboratórios (HOSHI, 2003). Entretanto, este sistema



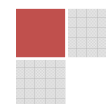
quase não tem sido usado na produção em larga escala de embriões in vitro devido à sua baixa praticidade, uma vez que é necessário a manutenção destas células em crescimento e cultivo, estando sujeitas a variações biológicas que podem levar a produção de fatores que afetariam negativamente o desenvolvimento embrionário (SANGILD, 2000). Recentemente, a utilização de meios semi-definidos com pouco ou sem soro e baixa tensão de oxigênio tem substituído quase que totalmente o co-cultivo com células ou sobre monocamadas (AVELINO et al., 2002).

O desenvolvimento embrionário in vitro é avaliado no 6º dia de cultivo visualizando-se a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocele, sendo que no 7º dia é feita a seleção e avaliação final dos embriões para a transferência a fresco ou para congelamento (THOMPSON, 2000).

3. CONCLUSÃO

A produção in vitro de embriões, aliada à aspiração folicular guiada por ultrasonografia, permitiu aumentar o potencial de fêmeas de alto valor genético, bem como de animais portadores de infertilidade adquirida que estavam condenados ao abate por incapacidade de produzir descendentes. A perspectiva de aplicação em diversas outras situações, assim como a dependência que outras biotécnicas possuem ao uso dos sistemas de cultivo in vitro, tem incentivado a realização de novas pesquisas envolvendo o aprimoramento da técnica e compreensão dos mecanismos biológicos que ocorrem durante este período de pré-implantação, como metabolismo embrionário e expressão de genes importantes para as subseqüentes fases do desenvolvimento. A otimização da técnica, envolvendo a produção de embriões de boa qualidade em números cada vez mais expressivo, associada à diminuição de alguns problemas que tem limitado seu uso em escala comercial, certamente contribuirá para o decréscimo do custo operacional da PIV, que ainda é alto em decorrência dos materiais e equipamentos utilizados, o que possibilitará a difusão desta tecnologia visando o aumento da produtividade da pecuária nacional.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- AVELINO, K.B., VANTINI, E., SENEDA, M.M., et al. In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, v.57, p.656, 2002.
- GALLI, C., DUCHI, R., CROTII, G. Et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.
- GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects 01IVM-IVF in cattle. **Anim. Reprod. Sei.**, v.42, p.371-379, 1996.
- HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.
- NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.
- RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. Fecundação in vitro em bovinos: aplicação comercial. **Arq. Fac. Vet. UFRGS Supl.**, v.28, p.186-187, 2000.
- SANGILD, P.T., SCHMIDT, M., JACOBSEN, H., et al. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1495-1504, 2000.
- THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci**, v.60-61, p.263-275, 2000.
- YOUNG, L.E., SINCLAIR, K.D., WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev. Reprod.**, v.3, p.155-163, 1998.

