

# **Biotécnica de produção *in vitro* de embriões bovinos**

**Paulo Roberto Adona**

**Samuel Gueira**

**Moisés dos Santos Miranda**

**Marcos Barbosa Ferreira**

**Gustavo Rodrigues Queiroz**

**Barbara Leticia Marchi da Silva**

**Outubro de 2017**

Paulo Roberto Adona  
Samuel Guemra  
Moysés dos Santos Miranda  
Marcos Barbosa Ferreira  
Gustavo Rodrigues Queiroz  
Barbara Leticia Marchi da Silva

# **Biotécnica de Produção *in Vitro* de Embriões Bovinos**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Selma Alice Ferreira Ellwein – CRB 9/1558

P495u Adona, Paulo Roberto, et al.  
Biotécnica de produção in vitro de embriões bovinos. / Paulo Roberto Adona, Samuel Guemra, Moysés dos Santos Miranda, Marcos Barbosa Ferreira, Gustavo Rodrigues Queiroz, Barbara Leticia Marchi da Silva. – Londrina: Editora Científica, 2017.

ISBN 978-65-00-12629-7

1. Embrião. 2. Fecundação. 3. Ovócito. I. Autores. II. Título.

CDD 619

**Editora Científica  
2017**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> -----	4
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b> -----	5
<b>2.1 Obtenção de ovários e ovócitos</b> -----	5
<b>2.2 Maturação <i>in vitro</i></b> -----	6
<b>2.3 Etapas da Fecundação</b> -----	7
<b>2.3.1 Separação espermática</b> -----	7
<b>2.3.2 Capacitação espermática</b> -----	8
<b>2.3.3 Reação do acrossomo</b> -----	8
<b>2.3.4 Fecundação</b> -----	9
<b>2.3.5 Fecundação <i>in vitro</i></b> -----	9
<b>2.4 Cultivo <i>in vitro</i></b> -----	10
<b>2.4.1 Clivagem</b> -----	11
<b>3 CONCLUSÃO</b> -----	12
<b>REFERENCIAS</b> -----	13

## Biotécnica de Produção *in Vitro* de Embriões Bovinos

Paulo Roberto Adona<sup>1</sup>

Samuel Gueimra<sup>1</sup>

Moysés dos Santos Miranda<sup>2</sup>

Marcos Barbosa Ferreira<sup>3</sup>

Gustavo Rodrigues Queiroz<sup>1</sup>

Barbara Leticia Marchi da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unopar - Mestrado em Saúde e Produção Animal, Araçatuba – PR, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Pará – Laboratório - LabTronVet, Castanhal - PA, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Anhanguera-Uniderp - Campus Agrárias, Campo Grande – MS, Brasil

### RESUMO

A biotécnica de produção *in vitro* de embriões possibilita várias aplicações importantes no âmbito da pesquisa e vem beneficiando projetos de melhoria genética nos rebanhos na área comercial. Entretanto, seu emprego ainda é deficitário principalmente pela baixa taxa de desenvolvimento embrionário. As condições de produção *in vitro* de embriões tem um papel fundamental, no sucesso desta biotécnica. Sendo assim, a obtenção de um sistema de produção *in vitro* de embriões que possibilite a obtenção de um maior número de embriões com melhor qualidade demanda a compreensão dos mecanismos envolvidos na biotécnica. Esta revisão discorre do processo de produção *in vitro* de embriões, abordando os estádios da maturação, fecundação e o cultivo *in vitro*. Com objetivo de orientar o leitor dos processos que envolvem a biotécnica de produção *in vitro* de embriões, visando sua melhoria e aplicabilidade.

**Palavras-chave:** Embrião. Fecundação. Ovócito.

### ABSTRACT

The biotechnology of *in vitro* embryo production allows several important applications in the scope of research and has been benefiting genetic improvement projects in herds in the commercial area. However, its use is still deficient mainly due to the low rate of embryonic development. The conditions of *in vitro* embryo production have a fundamental role in the success of this biotechnology. Therefore, obtaining an *in vitro* embryo production system that makes it possible to obtain a larger number of embryos with better quality demands an understanding of the mechanisms involved in biotechnology. This review discusses the process of *in vitro* embryo production, addressing the stages of maturation, fertilization and *in vitro* cultivation. In order to guide the reader of the processes involving the biotechnology of *in vitro* embryo production, aiming at its improvement and applicability.

**Keywords:** Embryo. Fertilization. Oocyte

## 1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões bovinos envolve as etapas de colheita, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) de ovócitos, bem como o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias (ADONA et al., 2008). É uma biotécnica utilizada, alternativamente, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e animais portadores de alterações adquiridas que impedem que a reprodução ocorra de forma natural ou até mesmo pela transferência de embriões (PELLEGRINO et al., 2016). Além desses aspectos, a produção *in vitro* de embriões também permite o aprofundamento dos conhecimentos relativos aos processos fisiológicos, bioquímicos e biotecnológicos das espécies de interesse do estudo, sem a necessidade de extrapolar resultados pertinentes a animais de laboratórios (FERREIRA et al., 2009; ADONA et al., 2011).

As técnicas de produção *in vitro* de embriões têm sido utilizadas nos diferentes seguimentos da reprodução assistida das áreas humana e animal (OLIVEIRA et al., 2017; GRÁZIA et al., 2016). Por todo potencial de aplicação que a produção *in vitro* de embriões representa para as espécies humana e animal, como pela sua expressividade tanto para a ciências básica quanto para a aplicada tem sido muito difundida e utilizada em diversos países, inclusive de forma destacada no Brasil.

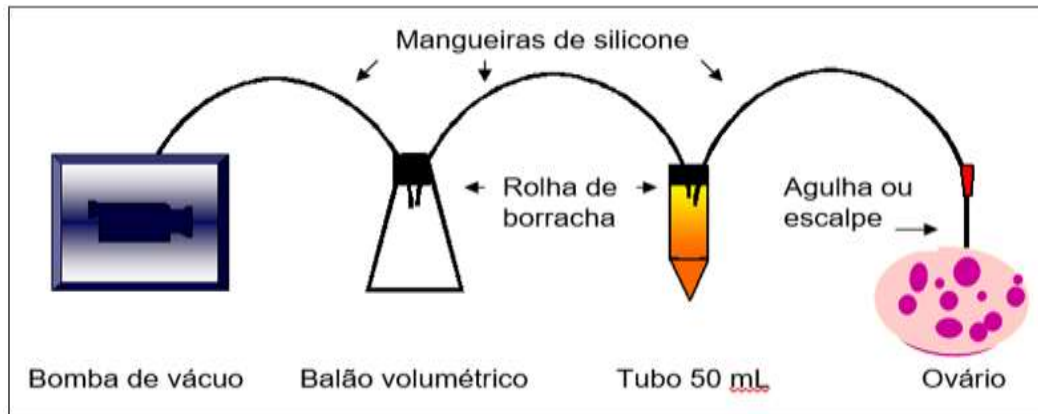
## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Obtenção de ovários e ovócitos

Os ovários podem ser obtidos de abatedouro ou *in vivo*, recomendado o transporte em solução salina, à temperatura de 30 °C, até a chegada ao laboratório. O tempo ideal entre a saída dos ovários do abatedouro e a adição dos ovócitos puncionados na maturação *in vitro* deve estar entre 4-6 horas, mas até 12 horas ainda há possibilidade de uso.

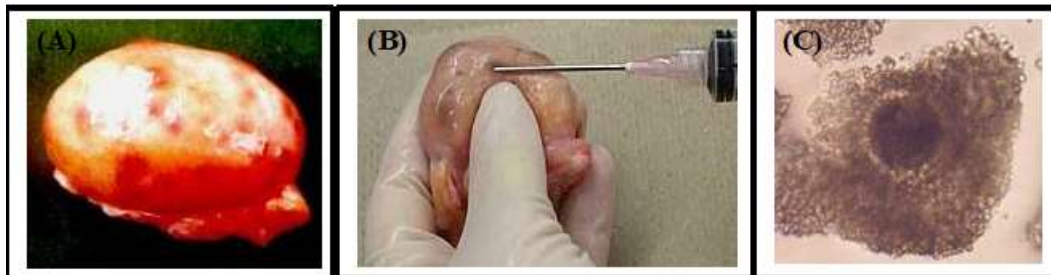
Os ovócitos bovinos podem ser obtidos de ovários de abatedouros, por aspiração folicular ovariana guiada por ultrassom (*Ovum pick-up* - OPU), dissecação folicular de ovários (*Chopper* – quando o número de ovários é reduzido), laparotomia ou laparoscopia. Para estudos geralmente usa-se ovários provenientes de abatedouros (Figura 1 e 2) é, geralmente, efetuada por meio de aspiração folicular com uma agulha (40 x 1.2 mm - 19 G) acoplada a uma seringa (5 ou 10 ml) ou bomba de vácuo (90 mm/Hg ou 10 ml/min), mas quando a obtenção de ovócitos é via OPU usa-se uma agulha (40 x 1.0 mm) acoplada (bomba de vácuo – 15 ml/min) no sistema de punção folicular, guiada por ultra-sonografia transvaginal (ADONA et al., 2008; GUEMRA et al., 2014).

**Figura 1-** Método de colheita de ovócitos com auxílio de uma bomba de vácuo



Fonte: Os autores.

**Figura 2** - Ovário bovino procedente de abatedouro (A). Método de colheita de ovócitos *in vitro* com auxílio de uma seringa (B). Ovócito bovino classificado como Grau



**Fonte:** Os autores.

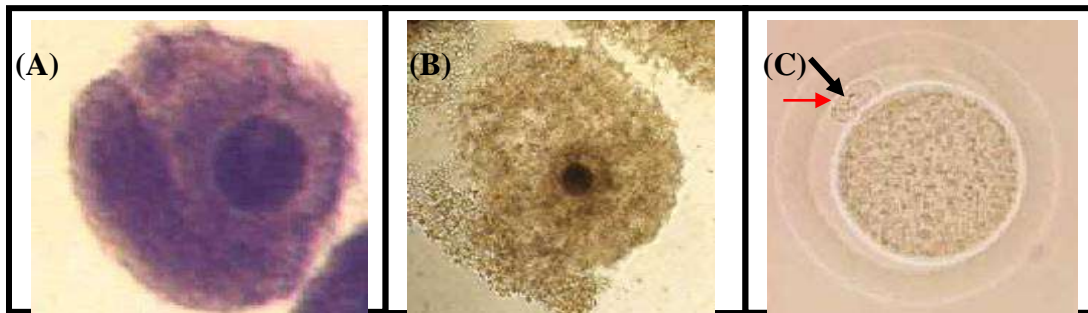
No sistema de Aspiração *in vitro* são coletados de 6 a 10 ovócitos de grau I e II por ovário, 15 ovários/45min. Se cortados em fatias (*slicing*): 12-20 ovócitos/min, mas é um procedimento muito mais trabalhoso. Já a recuperação de ovócitos puncionados *in vivo* (OPU) é de, aproximadamente, 60% dos folículos puncionados, obtendo-se de cada vaca, a média de 10 ovócitos.

Nos procedimentos de aspiração *in vitro* o líquido folicular contendo os ovócitos permanece em repouso por 5 minutos após determino da aspiração para decantação. A porção superior do líquido deve ser retirada com uma pipeta automática e, na porção restante, adicionar 3-5 ml de meio de cultivo TCM -199/Hepes (ADONA et al., 2008) acrescida de antibióticos suplementado com 5% de SFB (soro fetal bovino). O material do tubo deve ser transferido para uma placa de Petri (100 x 20 mm), para ser feita a classificação dos ovócitos sob estereomicroscópio. Somente ovócitos de classificações graus I e II, contendo três ou mais camadas de células do *cumulus oophorus* e citoplasma (ooplasma) uniforme com granulação finas e homogêneas de coloração marrom (Figura 2), devem ser utilizados para os experimentos.

## **2.2 Maturação *in vitro***

Após aspiração e seleção, os ovócitos devem ser transferidos para o meio de maturação *in vitro* (TCM-199 com 10% de SFB, 5,0 µg/ml de LH, 0,5 µg/ml de FSH e antibióticos). Os ovócitos devem ser cultivados em gotas de 100 µl de meio (no máximo 25 ovócitos por gota) sob óleo mineral por um período de 18 a 24 horas (Figura 3) a 38,5 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada (ADONA et al., 2008).

**Figura 3** - Ovócito imaturo com células do *cumulus* compacta (A), ovócito maturo com células do *cumulus* expandida (B) e ovócito maturo com extrusão do primeiro corpúsculo polar, seta (C)



Fonte: Os autores.

## 2.3 Etapas da Fecundação

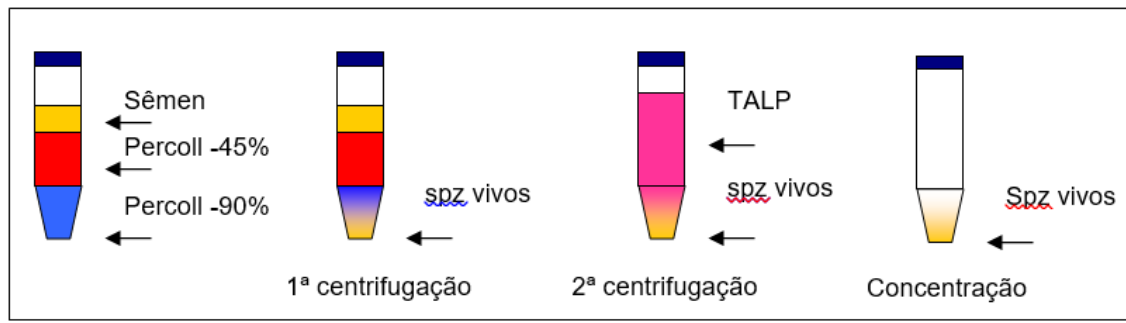
### 2.3.1 Separação espermática

A técnica mais usada para separação de espermatozoides vivos dos demais componentes do sêmen e dos crioprotetores é o gradiente de percoll.

Na separação espermática com o gradiente de percoll (Figura 4), o sêmen é centrifugado através da passagem por diferentes gradientes que permitir a separação dos espermatozoides vivos dos demais constituintes do sêmen, baseado na diferença de densidade. O percoll é composto por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente necessário de separação espermática. Para formar o gradiente de separação espermática o percoll comercial é diluído em meio TALP (PARRISH, 2014) formando uma solução de percoll 90%. Uma porção do percoll 90% é diluída com meio TALP formando o percoll 45%. Em um tubo de centrifuga é colocado 1 ml de percoll 45% e, em seguida adiciona-se cuidadosamente no fundo do tubo percoll 90%, sem permitir homogeneização entre as duas soluções. O gradiente de percoll pronto é colocado na estufa de CO<sub>2</sub> por 30 minutos antes do uso. O conteúdo de uma palheta de sêmen (O sêmen deve ser descongelado a uma temperatura de 36 – 37 °C por 1 minuto) é depositado lentamente na superfície do gradiente e, a seguir, é centrifugado a 600 G por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante é removido e os espermatozoides (pellet) são suspensos em 4 ml de meio TALP e, novamente centrifugado a 100 G por 1-2 minutos. Retirar novamente o sobrenadante e fazer a concentração espermática que será usado para a fecundação (ADONA et al., 2008)



**Figura 4** - Esquema simplificado das técnicas de separação espermática – gradiente de percoll. Espermatozoides (spz). Meio de fecundação comercial (TALP)



Fonte: Os autores.

### 2.3.2 Capacitação espermática

A capacitação espermática é de fundamental importância para que os espermatozoides tornem-se aptos para fecundação *in vitro*. Algumas glicosaminoglicanas presentes no trato genital feminino são responsáveis por induzirem a capacitação espermática *in vivo*. No processo *in vitro*, uma glicosaminoglicana, a heparina, tem sido utilizada para capacitação espermatozoides em bovinos.

Existe variação individual entre touros quanto à concentração de heparina necessária para a capacitação espermática. A concentração ideal de heparina varia de 2 a 100 µg/ml de meio, dependendo do touro e do processo de separação espermática. Um em cada cinco touros são aptos para a fecundação *in vitro*.

### 2.3.3 Reação do acrossomo

Na presença de cálcio extracelular, o espermatozóide capacitado tem a habilidade de se ligar à zona pelúcida do ovócito e sofrer a reação acrossomática. Para que o espermatozóide penetre na zona pelúcida e se fusione com a membrana plasmática do ovócito é necessário completar a reação acrossomática. A reação de acrossomo envolve a segmentação progressiva do acrossomo e a fusão das membranas plasmáticas e acrossomática, formando vesículas permitindo a liberação de enzimas e a exposição da membrana interna e *perforatorium*. A liberação dessas enzimas é importante para a penetração do espermatozóide e a fecundação do ovócito. A perda completa do acrossomo ocorre com a penetração do espermatozóide na zona pelúcida.

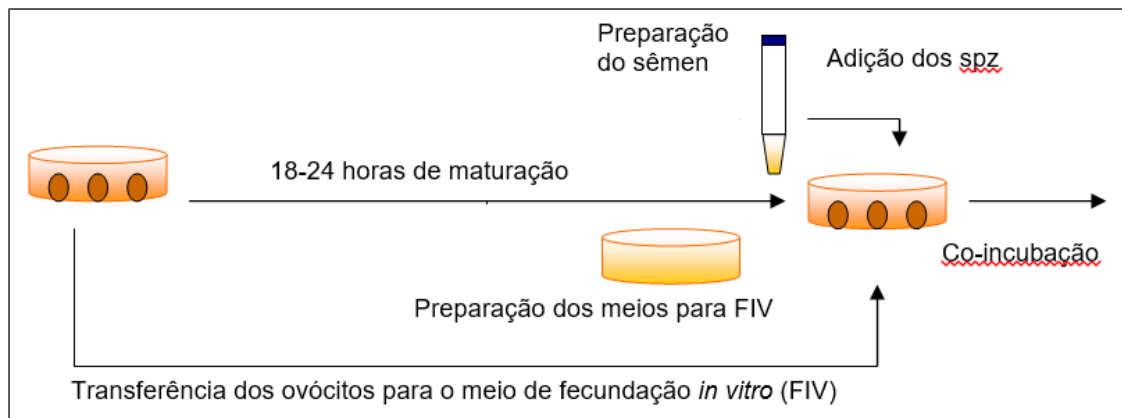
### **2.3.4 Fecundação**

A ligação do espermatozóide ao ovócito é mediada por receptores espermáticos espécie específicos presentes na zona pelúcida. As glicoproteínas constituintes da zona pelúcida, identificadas inicialmente em camundongos são denominadas de ZP1, ZP2 e ZP3 que apresentam importantes funções na fecundação. A ZP1 tem, basicamente, papel estrutural, enquanto tem sido atribuída a função de receptor secundário à ZP2 e receptor primário à ZP3, sendo que a ZP3 tem sido responsabilizada pela reação do acrossomo. O espermatozóide penetra na zona pelúcida pelas ações enzimáticas e mecânicas. A fusão do ovócito com o espermatozóide ocorre após a penetração, especificamente pelo contato entre o espermatozóide e a membrana plasmática do ovócito. A membrana plasmática participa ativamente nesse processo e, dessa forma, o espermatozóide é incorporado pelo citoplasma. O ovócito ativado pelo espermatozóide responde inicialmente com a despolarização da membrana plasmática, hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), aumento das oscilações intracelulares de cálcio, exocitose dos grânulos corticais, aumento do pH intracelular e da síntese protéica.

### **2.3.5 Fecundação *in vitro***

Após a maturação dos ovócitos e separação dos espermatozóides viáveis, deve-se proporcionar um ambiente adequado para que ocorra a capacitação espermática e a fecundação (Figura 5). Os espermatozóides devem ser adicionados na gota de fecundação a uma concentração final de 1.6 a 2 x 10<sup>6</sup> espermatozóides/ml. O meio mais utilizado para a fecundação é o TALP fecundação suplementado com 2 µM penicilamina, 1 µM hipotaurina, 250 µM epinefrina e 20 µg/ml heparina (167 UI/mg). Os espermatozóides e os ovócitos são co-incubados em gotas de 100 µl de meio sob óleo mineral em placa de Petri (35 x 10 mm) por um período de 18 horas, em uma estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada (ADONA et al., 2008).

**Figura 5** - Esquema simplificado das etapas da fecundação *in vitro*.



Fonte: Os autores.

## 2.4 Cultivo *in vitro*

É necessário, no cultivo embrionário, o uso de meio simples que suporte a nutrição celular e o desenvolvimento durante a fase de pré-implantação embrionária. Após as 18 horas de co-incubação no meio de fecundação, os ovócitos/zigotos devem ser transferidos para o meio de cultivo (HOLM et al., 1999). Os ovócitos devem ser cultivados em gotas de 100  $\mu$ l de meio sob óleo mineral por um período de 7 dias a 38,5° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada. Quarenta e oito horas após a inseminação dos ovócitos as células do *cumulus oophorus* dos ovócitos/zigotos devem ser removidas manualmente (ou mecanicamente no vortex) com auxílio de uma micropipeta de vidro e, seguida e feita a avaliação da taxa de clivagem. Os ovócitos que clivaram continuaram no mesmo meio de cultivo em co-cultivo com as células do cumulus removidas dos próprios ovócitos. As avaliações da formação de blastocisto devem ser acompanhadas a partir do dia 6 após a inseminação dos ovócitos.

A ativação do genoma embrionário coincide com período crítico de cultivo, resultando em bloqueio do desenvolvimento em muitas espécies. Esse bloqueio aparece na transcrição deficiente do genoma embrionário e subsequente síntese protéica relacionada às condições metabólicas. Em bovinos, o bloqueio ocorre no estágio de 8 – 16 células causado por cultivo inadequado. Vários métodos de cultivos são usados na tentativa de melhorar o desenvolvimento *in vitro*. No co-cultivo de embriões tem sido usado as células BOEC (células epiteliais de oviduto bovino), GC (células da granulosa), vesículas trofoblásticas, células VERO (linhagens celulares estabelecidas para cultivo), células BRL (buffalo rat liver cells), células endometriais ou o cultivo em meio condicionado por vários tipos celulares.

Atualmente, o co-cultivo dos embriões com células somáticas, para o desenvolvimento embrionário precoce, têm sido substituídos pelos sistemas que utilizam 5% de O<sub>2</sub>, meios simples como o CR-1, CR-2, SOF e KSOM acrescidos de aminoácidos e sem co-cultivo celular. Esses sistemas podem ser utilizados com meios quimicamente definidos ou com soro sanguíneo.

#### **2.4.1 Clivagem**

Ao final da singamia, origina-se o zigoto com novo arranjo citoplasmático e começa a formação de um organismo multicelular com outro potencial genético. Nesta fase, tem início uma série de divisões mitóticas, por meio das quais o zigoto, que possui uma célula com grande volume, se divide em duas, quatro e assim por diante até a formação do blastocisto que possui numerosas células nucleadas de menor tamanho. Esse processo é conhecido como clivagem e as células resultantes da clivagem são denominadas de blastômeros. Os fenômenos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* podem ser afetados por uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos como íons inorgânicos, tampões, composição da atmosfera gasosa, aminoácidos, pH, fatores de crescimento, luminosidade, vitaminas e macromoléculas. Embriões bovinos produzidos *in vitro* são muito sensíveis às condições de cultivo.

### **3 Conclusão**

As etapas de desenvolvimento embrionário *in vitro* podem ser afetados por uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos. O uso de procedimentos adequados pode melhorar a qualidade e a quantidade de embriões provenientes da produção *in vitro* de embriões. Porém, mais estudos são necessários para obtermos melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na biotécnica, visando sua melhoria e aplicabilidade.

## REFERENCIAS

ADONA, P.R. et al. Embryonic development and gene expression in oocytes cultured *in vitro* in supplemented pre-maturation and maturation media. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, n.1, p.31-8, 2011.

ADONA, P.R. et al. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. *Animal Reproduction Science*, v.108, n.1, p.49-65, 2008.

FERREIRA, E.M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v.15, n.71, p.836-48, 2009.

GUEMRA, S. et al. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus-oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, v.15, n.81, p.982-987. 2014.

GRÁZIA, J.G.V. et al. Desempenho de doadoras leiteiras mestiças F1 (Gir x Holandês) no sistema de produção *in vitro* de embriões. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.68, n.3, p.605 – 610, 2016.

HOLM, P. et al. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, v.52, n.4, p.683-700, 1999.

OLIVEIRA, R. et al. Progesterone level on the day of hCG administration in relation to the pregnancy rates of patients undergoing assisted reproduction techniques. *Einstein*, v.15, n.3, p.273 – 277, 2017.

PARRISH, J.J. Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, v.1, n.81, p.67-73, 2014.

PELLEGRINO, C.A. et al. Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of *in vitro*-produced embryos in cattle. *Theriogenology*, v.86, n.3, p.888-93, 2016.