

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CAMPUS DE CURITIBANOS

CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

JÚLIA KOCH

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE
MICROMANIPULAÇÃO**

Curitibanos-SC

2017.1

JÚLIA KOCH

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE
MICROMANIPULAÇÃO**

Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Catarina – Campus de Curitibanos, Centro de Ciências Rurais, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta e supervisão do Prof. Dr. Alfredo Quites Antoniazzi.

Curitibanos-SC

2017.1

Dedico este trabalho a toda minha família, aos quais nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Principalmente, ao meu avô Eugênio Savaris (*in memoriam*) que sempre torceu muito por mim, aqui está a grande “bandeira branca” vô.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida, pela proteção, saúde, perseverança e por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

Agradeço ao meu avô Eugênio Savaris (*in memoriam*) por ter sido o melhor avô do mundo, por estar sempre torcendo por mim, me ajudando e me cobrando para ser a pessoa que sou hoje. Muito do que sou devo a ti e aqui estou com a grande “bandeira branca” na mão. Como não posso te entregar pessoalmente, te entrego em oração. Te amo, meu Especial.

Agradeço aos meus pais Waldir e Marinês e aos meus irmãos Eduarda e Tiago (de coração) por terem sido alicerce das minhas conquistas, estando presentes mesmo com a distância física, fazendo o possível e o impossível para que eu realizasse os meus sonhos. Amo muito vocês.

Agradeço também a todas as pessoas das minhas famílias Savaris e Koch, meus avós, meus tios e primos que sempre me esperavam com festa e comilança. Sou muito grata por ser abençoada com duas famílias maravilhosas.

Agradeço aos meus amigos pela alegria que trazem na minha vida, compartilhando momentos bons e difíceis. Mesmo não nos vendo todos os dias a amizade contínua intacta. Obrigada por existirem na minha vida, Carol Frighetto, Bárbara, Giana, Leilua, Simone, Mariana Meneguzzi, Carol Mondini, Carol Milak, Carol Soares, Taciane, Marcella, Mariana Besen, Tainara, Tamires, Karine, Rodrigo. Amo vocês.

Agradeço aos meus mestres que passaram de forma brilhante o seu conhecimento para que eu formasse o meu. Agradeço principalmente ao professor Marcos Henrique Barreta que me orientou desde o começo da graduação, sendo um exemplo de profissional e de pessoa. Obrigada por todas as oportunidades que me proporcionou, pelo conhecimento repassado e pela paciência. Quando “crescer” quero ser igual a você!

Agradeço aos Médicos Veterinários que tive oportunidade de acompanhar e com certeza, foram ímpares para a formação do meu conhecimento e da tomada de decisão de que área seguir na Medicina Veterinária. Obrigada André Goetten, Márcio Lermen e Fabiano Cruz pelo conhecimento e amizade.

Agradeço ao professor e meu supervisor de estágio, Alfredo Quites Antoniazzi por ter me dado a oportunidade de estagiar em um laboratório de excelência. Obrigada pela paciência em ouvir a minha indecisão, pelo conhecimento e pela amizade. Embora o conheça há pouco tempo, és um exemplo para mim.

Agradeço aos alunos de doutorado do BioRep, João Ricardo Malheiros de Souza e Vitor Braga Rissi, por terem me apresentado a ICSI e SCNT. Agradeço imensamente a paciência e o esforço que fizeram para me ensinar essas duas técnicas que fazem “brilhar meus olhos”.

Agradeço a família BioRep por me receber tão bem, fazendo me sentir em casa desde o primeiro dia. Agradeço pelo conhecimento e amizade. Aprendi muito com vocês e espero poder aprender muito mais.

Agradeço aos professores Marcos Barreta, Valério Portela e ao médico veterinário André Goetten por todas as oportunidades e aprendizado obtidos durante o período de iniciação científica no Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal (LAFRA – UFSC), motivo hoje da minha escolha profissional. Especialmente ao professor Valério pelos conselhos que me auxiliaram a decidir minha vida profissional.

Obrigada Monica e Luan por terem sido a minha família em Santa Maria. São grandes amigos que levarei sempre comigo.

Agradeço também aos animaizinhos mais especiais do mundo. Obrigada Mel por aparecer na minha vida e com a sua simpatia e amor mudar ela totalmente. Foi por ti que comecei a Medicina Veterinária, é meu amor eterno. Obrigada Maria Isabel por me fazer companhia durante a graduação e estágio, por complicar a minha vida, roer meus resumos de provas e todas as minhas coisas, mesmo assim, amo muito você.

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante” .

(Alberto Schuwweiter)

RESUMO

A biotecnologia da reprodução animal é uma área importante da pesquisa científica, já que através dela tornou-se possível aprimorar alguns impasses da fisiologia reprodutiva masculina e feminina. O desenvolvimento de novas tecnologias capazes de transgredir as limitações até então encontradas, vem aumentando as chances de sucesso da reprodução assistida animal e humana. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos através de técnicas que utilizam a micromanipulação dos gametas, como a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e a clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT), vêm sendo amplamente utilizadas pelo Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep) da Universidade Federal de Santa Maria – RS, como ferramentas de pesquisa e com o objetivo de melhorar a eficiência destas técnicas. A ICSI consiste na fecundação do gameta feminino inserindo um único espermatozoide no ooplasma de um oócito maturado, com sua principal aplicação relacionada a infertilidade masculina. Já a SCNT consiste na utilização de um citoplasto, onde seu núcleo é substituído por uma célula somática, tendo como função reprogramar o núcleo doador e produzir um organismo geneticamente idêntico ao qual derivou o material nuclear. A presente monografia está sendo apresentada como requisito parcial para a conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina e apresenta uma revisão da literatura a respeito da importância, manipulação, aplicabilidade e impasses encontrados nas técnicas de ICSI e SCNT, bem como, descrever a forma com que essas técnicas são realizadas no BioRep.

Palavras-chave: PIVE, bovinos, ICSI, SCNT, Reprodução Assistida.

ABSTRACT

Animal reproduction biotechnology is an important area of scientific research, which enables the elucidation of several aspects in male and female reproductive physiology. The development of new transgressive technologies to overcome existing limitations has enhanced the chances of success in animal and human assisted reproduction. The Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction (BioRep) from the Federal University of Santa Maria – RS has been widely applying *in vitro* production (IVP) of bovine embryos through gamete micromanipulation, such as intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and somatic cell nuclear transfer cloning (SCNT) as research tools, focusing on improving the efficiency of these techniques. Intracytoplasmic sperm injection consists of fertilizing the female gamete by inserting a single spermatozoa into the mature oocyte, mainly applied to surpass male infertility. In SCNT, oocyte nucleus is replaced by a somatic cell with the purpose of reprogramming the donor nucleus and producing a genetically identical organism from which the nuclear material was derived. The aim of this monograph of course conclusion is to present a literature review about the importance, manipulations, applications and difficulties encountered in ICSI and SCNT techniques and, moreover, to describe how these techniques are performed at the BioRep.

Keywords: EIVP, Cattle, ICSI, SCNT, Assisted Reproduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Equipamentos necessários para a realização de técnicas de micromanipulação	18
Figura 2 – Ponteiros de micromanipulação de gametas.....	21
Figura 3 – Placas para a micromanipulação de gametas e células.....	22
Figura 4 – Sistema de aspiração folicular <i>in vitro</i>	24
Figura 5 – Oócitos classificados de acordo com a qualidade conforme descrito por LEIBFRIED & FIRST (1979)	25
Figura 6 – Avaliação da maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos	28
Figura 7 – Reação do acrossoma	32
Figura 8 – Estrutura de um espermatozoide bovino, dando ênfase ao acrossomo	34
Figura 9 – Placa de 60 mm preparada para a manipulação de ICSI, recoberta com óleo mineral	35
Figura 10 – Detalhes de micromanipulação na ICSI	36
Figura 11 – Placa de 60 mm preparada para a manipulação de SCNT, recoberta com óleo mineral	45
Figura 12 – Detalhes da micromanipulação de clonagem por SCNT.....	47
Figura 13 – Esquematização da técnica de clonagem por transferência nuclear de célula somática (SCNT)	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de acordo com a qualidade de oócitos bovinos, em escala de 1 a 4, considerando as características do *cumulus* e do ooplasma, segundo GONÇALVES *et al.* (2008) adaptado de LEIBFRIED e FIRST (1979)26

Tabela 2: Taxas de formação de dois pró-núcleos, clivagem e blastocistos de experimentos realizados por Jo *et al* (2014) comparando a fecundação através da utilização de sêmen sexado (ss) ou sêmen convencional (cs) nas técnicas de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e fecundação *in vitro* (FIV) convencional.....38

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BioRep	Laboratório de Biotecnologia e Reprodução animal – UFSM.
Ca ²⁺	Cálcio.
CB	Citocalasina B.
CHX	Ciclohexamida.
CIV	Cultivo <i>in vitro</i> .
CO ₂	Dióxido de carbono.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
FIV	Fecundação <i>in vitro</i> .
FSH	Hormônio folículo estimulante.
GBVD	Vesícula germinativa rompida.
HMC	<i>The Handmade Cloning</i> .
IA	Inseminação Artificial.
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides.
IP ₃	Inositol trifosfato.
LH	Hormônio luteinizante.
LOS	<i>Largue-offspring syndrome</i> .
M	Molar.
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos.
MIV	Maturação <i>in vitro</i> .
MPF	Fator promotor de maturação.
mL	Mililitro.
mM	Milimolar.
mm	Milímetros.
mmHg	Milímetros de mercúrio.
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro.
NaCl	Cloreto de sódio.
nM	Nanomolar.
OPU	<i>Ovum pick-up</i> .
PIV	Produção <i>in vitro</i> .
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões.

PVP	Polivinilpirrolidona.
SCNT	Transferência nuclear de célula somática.
SOF	Fluido sintético de oviduto.
TCM	<i>Tissue Culture Medium</i> .
TSA	Tricostatina A.
SCNT	<i>Somatic Cell Nuclear Transfer</i> (Transferência nuclear de células somáticas).
SrCl ₂	Cloreto de estrôncio.
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria.
UI	Unidades internacionais.
μl	Microlítro.
μm	Micrometro.
μM	Micromolar.
μg	Micrograma.
5-aza-dC	5-aza-2'-deoxycytidine
6-DMAP	6-dimetilaminopurina.
°C	Graus Celsius.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 MICROMANIPULAÇÃO DE GAMETAS	17
2.1 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA MICROMANIPULAÇÃO	18
2.1.1 Características do microscópio	19
2.1.2 Ponteiros de injeção e manutenção	19
2.1.3 Preparo dos equipamentos para a micromanipulação	21
3 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	23
3.1 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS BOVINOS	23
3.2 INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS ...	29
3.2.1 Evolução histórica da ICSI	30
3.2.2 ICSI em bovinos	30
3.2.3 Técnica de ICSI segundo protocolo realizado no BioRep	34
3.2.4 Aplicações técnicas da ICSI em bovinos	37
3.3 CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM BOVINOS	38
3.3.1 Evolução histórica da SCNT	39
3.3.2 SCNT em bovinos	40
3.3.2.1 Reprogramação Nuclear	41

3.3.2.2 Relação citoplasto x Núcleo doador.....	43
3.3.2.3 Ativação oocitária.....	43
3.3.3 Técnica de SCNT segundo protocolo realizado no BioRep.....	44
3.3.4 Aplicações técnicas da clonagem por SCNT em bovinos	49
4 CONCLUSÃO	51
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia da reprodução animal é uma área importante da pesquisa científica. Através dela tornou-se possível aprimorar alguns impasses da fisiologia reprodutiva masculina e feminina; produzir animais geneticamente superiores; desenvolver técnicas capazes de reverter a infertilidade na espécie humana; restituir espécies ameaçadas de extinção; formar bancos de germoplasma animal; e produzir órgãos humanos através de transgenia ou clonagem (GONÇALVES et al., 2014). Além disso, ao pensar em eficiência reprodutiva dos rebanhos atuais, é primordial conceder mérito ao uso das biotécnicas aplicadas à reprodução.

Segundo Bertolini & Bertolini (2009), os avanços das biotécnicas assistidas da reprodução podem ser divididos em quatro gerações. Fazem parte da primeira geração a inseminação artificial (IA) e o congelamento de embriões e gametas. A segunda é caracterizada pela superovulação e transferência de embriões. A terceira pela fecundação *in vitro* (FIV), sexagem de gametas e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). E a quarta geração por procedimentos experimentais, bem como, clonagem por transferência nuclear, transgenese e o estudo da biologia de células tronco.

O desenvolvimento de novas tecnologias capazes de transgredir as limitações até então encontradas na reprodução assistida, vem auxiliando a compreensão de mecanismos fisiológicos intracelulares fundamentais para a reprodução animal e humana. Com o intuito de produzir embriões *in vitro*, algumas técnicas foram desenvolvidas e descritas na literatura, porém, ainda apresentam algumas limitações que precisam ser compreendidas. A primeira delas a ser desenvolvida foi a fertilização *in vitro* (FIV) de embriões, seguida da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e a clonagem por transferência nuclear.

Das técnicas acima citadas, a ICSI e a clonagem são dependentes de micromanipulação, sendo necessários equipamentos que possibilitem uma minuciosa manipulação dos gametas, bem como, um bom treinamento por parte do manipulador para que atinja sucesso na técnica.

A injeção intracitoplasmática de espermatozoide consiste na injeção de um único espermatozoide diretamente no citoplasma do gameta feminino maturado. A ICSI é uma técnica alternativa a FIV convencional, que passou a ser descrita por Palermo et al. (1992), com o intuito de tentar solucionar os problemas relacionados com a infertilidade do macho, bem como, tentar melhorar a PIV em espécies em que a FIV não é tão eficiente, como em suínos e equinos. Porém, ainda apresenta alguns impasses que precisam ser resolvidos para uma melhor eficiência da técnica, entre eles estão: problema com a ativação completa do oócito (YANAGIMACHI, 2005); capacitação inadequada dos espermatozoides antes da ICSI (WEI & FUKUI, 1999); assincronia na formação de pró-núcleos masculinos e femininos (NAGY et al., 1998); e falha na descondensação do material genético do espermatozoide relacionada com o acrossoma (MOROZUMI & YANAGIMACHI, 2005).

Na clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT), o material genético contido no citoplasma do oócito é substituído por uma célula somática. Essa biotécnica promete a preservação de espécies, propagação do rebanho com características zootécnicas de interesse, uso terapêutico de células clonadas e produção de animais transgênicos (BORDIGNON, 2011). Entretanto, estudos certificam que apenas 2 a 4% dos embriões clonados resultam em animais nascidos vivos. O motivo da baixa taxa de desenvolvimento embrionário e natalidade são relacionadas com a incompleta reprogramação nuclear dos embriões clonados (WOLF et al., 2001).

A presente monografia está sendo apresentada como requisito parcial para a conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária. Ao longo do documento foram descritas e discutidas as técnicas de micromanipulação realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep) da Universidade Federal de Santa Maria, discorrendo sobre a importância, as limitações e impasses obtidos em cada uma delas e as aplicações práticas em que as mesmas podem ser utilizadas visando melhorar as taxas reprodutivas dos rebanhos. Além disso, foi realizada uma abordagem sobre os equipamentos e procedimentos utilizados durante a micromanipulação dos gametas femininos e masculinos.

2 MICROMANIPULAÇÃO DE GAMETAS

As técnicas de micromanipulação começaram a ser descritas no século XVIII, onde os cientistas da época acoplavam agulhas em microscópio com o intuito de tocar microscopicamente nas células. A partir do descobrimento das possibilidades envolvendo a micromanipulação, diversas técnicas foram desenvolvidas e os equipamentos empregados foram sendo aprimorados, até chegar nos atuais sistemas e técnicas que usamos na embriologia moderna (MALTER, 2016).

Durante a segunda metade do século XX, a micromanipulação foi amplamente empregada e desenvolvida nas técnicas de reprodução assistida humana e animal. Segundo Verlinsky & Kuliev (1992), as técnicas de micromanipulação já estavam sendo amplamente utilizadas na reprodução animal, como forma de diagnóstico genético pré-implantacional, bissecção de embriões para a produção de gêmeos, clonagem por transferência nuclear, biópsia de embriões para sexagem e micromanipulação de espermatozoides. A partir desse ano, outra técnica de micromanipulação começou a ter importância na reprodução, após Palermo et al. (1992) descreverem a técnica de ICSI em humanos.

Desde então, as técnicas de micromanipulação se tornaram de suma importância para a reprodução assistida, possibilitando por exemplo: reverter a infertilidade masculina, diagnosticar precocemente possíveis doenças herdáveis, escolher o sexo do embrião, acelerar o melhoramento genético dos rebanhos e conservar características desejáveis. Embora sejam técnicas promissoras, alguns aspectos necessitam ser revisados para aprimorá-las, o que as tornam ferramentas de estudo científico (VERLINSKY & KULIEV, 1992).

Segundo Page & Malcuit (2014), 75% do sucesso das técnicas está relacionado com boas ferramentas de manipulação. Porém, a manipulação minuciosa também é fator crucial para atingir resultados satisfatórios. Por conseguinte, é de suma importância conhecer os equipamentos e materiais utilizados na micromanipulação de gametas, bem como, entender o princípio das técnicas. A seguir será explanado sobre os equipamentos e as características da micromanipulação de clonagem por

transferência nuclear de célula somática (SCNT) e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

2.1 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA MICROMANIPULAÇÃO

Para a realização das técnicas de micromanipulação, é imprescindível dispor: (1) um microscópio invertido com objetivas de baixa potência e alta potência, acessórios ópticos para realçar o contraste e lâmpada de epi-fluorescência (Figura 1A). (2) Micromanipuladores montados no microscópio invertido, que podem ser elétricos (*Eppendorf*[®] e *Burleigh*[®]), mecânicos (*Leica*[®]) ou hidráulicos (*Narishige*[®]) de acordo com a sua origem de produção (Figura 1B). (3) Microinjetores com sistema de óleo de parafina, que permitem a aspiração e expulsão dos conteúdos que serão manipulados através de compressibilidade (Figura 1C). (4) Ponteiros de microinjeção acoplados aos microinjetores (PAGE & MALCUIT, 2014). (5) placas de manipulação compatíveis para o encaixe na platina.

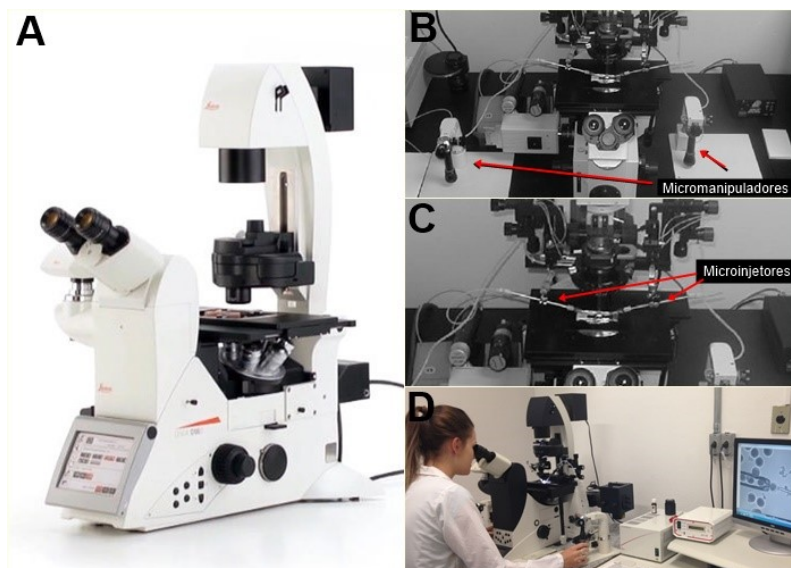


Figura 1: Equipamentos necessários para a realização de técnicas de micromanipulação. A) Microscópio invertido para gerar uma imagem em posição real. B) As flechas indicam os micromanipuladores direito e esquerdo, necessários para promover um sistema de compressão para a manipulação. C) As flechas indicam os microinjetores direito e esquerdo que permitem a aspiração e

injeção durante a manipulação. D) Sistema completo de micromanipulação, contendo: microscópio invertido, micromanipuladores, microinjetores e ponteiras. O microscópio com câmera interligada a uma tela de computador mostra a manipulação em tempo real. **Fonte:** A – *Leica Microsystems*[®]. B-C - PAGE & MALCUIT (2014). D – arquivo pessoal.

É de suma importância que o local de manipulação e a mesa em que o microscópio for disposto sejam apropriados, de forma com que, possibilitem tornar o ambiente isolado de vibrações. Caso contrário, qualquer movimento pode ser transmitido para as pipetas interferindo no procedimento (PAGE & MALCUIT, 2014).

2.1.1 Características do microscópio

É necessária a utilização de microscópio invertido, já que gera uma imagem idêntica à posição em que a placa de manipulação está disposta sobre a platina, assim, tornando possível comandar a técnica conforme a placa com os gametas e células estão sendo visualizados. As objetivas de menor aumento (2 - 4 x) possibilitam a visualização de todo o campo, facilitando a manipulação geral das células. Já as objetivas de maior aumento (20 - 40 x), promovem uma imagem mais detalhista das células, possibilitando uma manipulação mais minuciosa (PAGE & MALCUIT, 2014).

2.1.2 Ponteiras de injeção e de manutenção

As ponteiras de micromanipulação são confeccionadas a partir de capilares de vidro de 1 mm de diâmetro externo, 0,75 mm de diâmetro interno e 15 cm de comprimento. Com auxílio de equipamentos, é possível tornar o capilar de diâmetro adequado para cada técnica que será usada, ou se for mais conveniente, algumas empresas comercializam as ponteiras de microinjeção prontas para o uso.

Os equipamentos necessários para fabricar as ponteiros são: um extrator, que com seu sistema de aquecimento alonga a ponteira a tornando do diâmetro necessário; um *microforge* para moldar a ponta da ponteira e permitir eixo de movimento quando acoplada no microinjetor; um moedor de ponteiros para fazer as pontas biseladas das ponteiros de injeção; um lápis com ponta de diamante para fazer as pontas arredondadas das ponteiros de manutenção; e uma lamparina para permitir os ajustes finais sem deixar migalhas de vidro (PAGE & MALCUIT, 2014).

A ponteira de manutenção (*holding pipette*) tem como função segurar e posicionar o oócito de acordo com o objetivo da técnica. O seu diâmetro externo deve ser de 90% do diâmetro do oócito e o interno correspondente a 20% (Figura 2A), dessa forma, mantém o oócito firme para a manipulação e evita causar lesões (PAGE & MALCUIT, 2014). Geralmente, a ponteira de manutenção para ICSI e clonagem tem um diâmetro de 50-100 μm . É importante também, que a ponta da ponteira esteja bem polida e sem pontas cortantes para não lesionar o oócito.

A ponteira de injeção (*inject pipette*) é responsável por injetar o material de interesse no interior do oócito, ou seja, um espermatozoide no caso da ICSI ou uma célula somática no caso de clonagem. Durante a sua confecção, deve-se priorizar uma ponta bem mais fina do que a pipeta de manutenção e a presença de um bisel (Figura 2B) bem polido. Geralmente, a *inject* para clonagem por transferência nuclear deve ter aproximadamente 20 μm e a de injeção intracitoplasmática de espermatozoide de 9-12 μm . Essa diferença de diâmetro entre as ponteiros das duas técnicas é decorrente do tipo de manipulação a qual serão submetidos os oócitos. Na clonagem por SCNT é necessária a remoção de parte do ooplasma, justificando a necessidade de possuir um maior calibre. Já na ICSI, a ponteira deve ter apenas o diâmetro necessário para a passagem do espermatozoide, visando lesionar o mínimo possível o oócito.

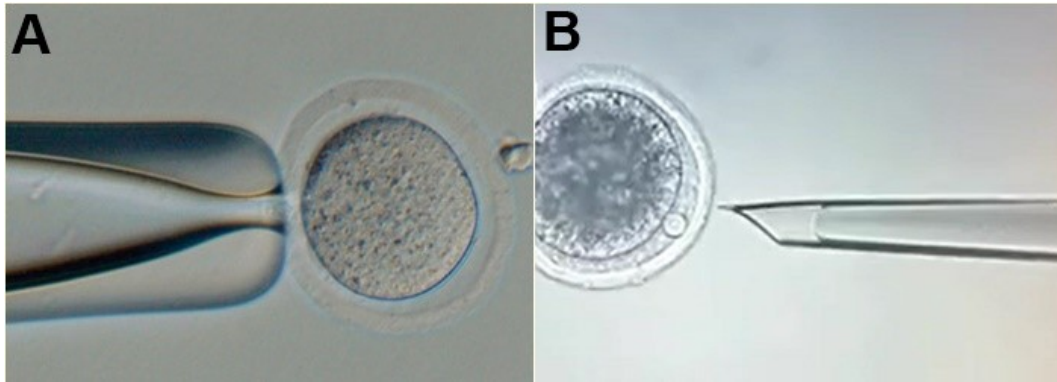


Figura 2: Ponteiras de micromanipulação de gametas. A) Ponteira de manutenção (*holding pipette*) responsável por posicionar e fixar o ócito durante a manipulação. B) Ponteira de injeção (*inject pipette*) responsável por injetar o espermatozoide (ICSI) ou a célula somática (SCNT) no interior do ócito.

Fonte: A - KISHIGAMI et al. (2006). B – arquivo pessoal.

2.1.3 Preparo dos equipamentos para a micromanipulação

Antes de iniciar a manipulação dos gametas, deve-se deixar montado o sistema de micromanipulação visando tornar mais eficiente a técnica. O primeiro passo é ligar o microscópio invertido, e após, conferir se a compressão do sistema de micromanipulação (micromanipuladores e suas mangueiras com óleo) está correta, acoplar as ponteiras nos microinjetores, de forma com que a *holding* fique no lado esquerdo e a *inject* no lado direito, e configurar a compressão dos microinjetores. Então, a placa de manipulação deve ser colocada sobre a platina do microscópio invertido para os ajustes finos das ponteiras, ou seja, o posicionamento delas na altura certa para a manipulação, utilizando as gotas de ajuste do micromanipulador (figura 3), compostas de TCM-199[®] lavagem (conforme descrito por GONÇALVES et al., 2008). A composição das demais gotas das placas de ICSI e SCNT serão descritas nos itens 3.2.3 e 3.3.3, respectivamente.

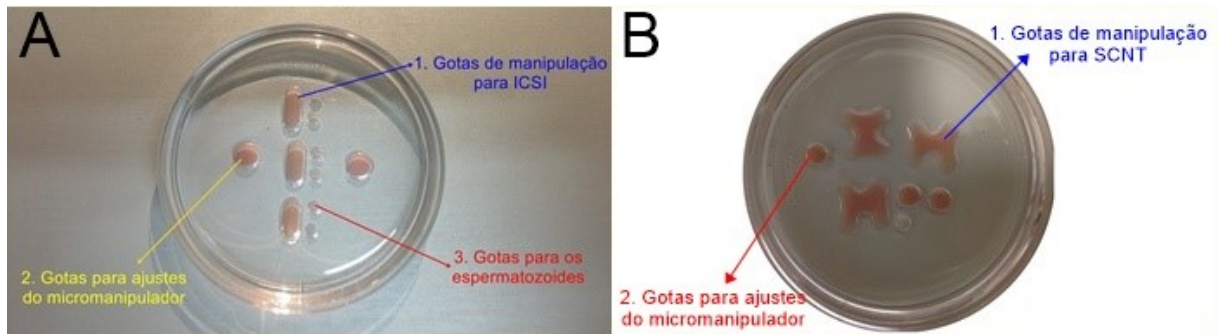


Figura 3: Placas para a micromanipulação de gametas e células. A) Placa de micromanipulação para injeção intracitoplasmática de espermatozoides (a composição de cada gota está descrito no item 3.2.3). B) Placa de micromanipulação para clonagem por transferência nuclear de células somáticas (a composição de cada gota está descrito no item 3.3.3).

A partir do momento que o sistema de micromanipulação estiver montado e pronto para o uso, deve-se transferir o grupo de oócitos para a gota destinada da placa de manipulação (figura 3). Os espermatozoides ou as células somáticas também devem ser dispostos nas suas gotas. E então, iniciar a micromanipulação conforme descrito para cada técnica nos itens 3.2.3 (ICSI) e 3.3.3 (SCNT).

Embora o sucesso das técnicas dependa de um menor tempo de manipulação, não há um tempo limite, já que os meios não desestabilizam em condições do ambiente. Manter os gametas em um sala climatizada é fundamental para que não sofram com o choque térmico decorrente de variação de temperatura, consequentemente perdendo sua viabilidade. Associar a platina aquecedora ao microscópio é recomendado para a manipulação, já que mantem os gametas em uma temperatura constante. O microscópio do BioRep não dispõe de platina aquecedora, mas com o objetivo de minimizar a variação de temperatura liga-se o microscópio aproximadamente 30 minutos antes do uso, visando manter a platina aquecida pela própria lâmpada do microscópio, associada à climatização do ambiente (25 °C).

3 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

A produção *in vitro* de embriões é uma biotecnologia da reprodução amplamente utilizada no ambiente científico e comercial, com o intuito de aprimorar o conhecimento técnico, acelerar o melhoramento genético dos rebanhos ou ainda reproduzir animais impossibilitados de gerar prole por métodos tradicionais. A PIVE corresponde a uma sequência de eventos que resumidamente, compreendem: (1) a coleta dos oócitos (*in vivo* ou *in vitro*); (2) a maturação *in vitro* (MIV); (3) a fecundação *in vitro* (FIV) ou injeção intracitoplasmática do espermatozoide (ICSI) ou clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT); (4) cultivo *in vitro* (CIV) e avaliação do desenvolvimento embrionário; (5) transferência dos embriões produzidos para receptoras.

O relato do primeiro animal nascido a partir de produção *in vitro* de embriões (PIVE) foi de um coelho em 1959 (CHANG, 1959). E teve sua expansão após 1978, quando nasceu o primeiro produto de uma PIVE humana do mundo (STEPTOE & EDWARDS, 1978). Em bovinos, os primeiros relatos de MIV e FIV começaram no final da década de 70 e em 1982 nasceu o primeiro bezerro oriundo de PIVE (BRACKETT et al., 1982). Desde então, houve uma expansão das técnicas de produção *in vitro* de embriões no mundo e o estabelecimento no Brasil (GONÇALVES et al., 2008), tornando o país referência na realização da PIVE, com mais de 60% da produção de embriões FIV do mundo (IETS, 2014).

3.1 MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

A primeira etapa da PIVE é a preparação dos oócitos para a maturação. Para isso, são obtidos ovários em abatedouro ou realizada a aspiração folicular guiada por ultrassom *in vivo*, dependendo do objetivo de destino dos embriões que serão produzidos. Para o uso em pesquisa, os oócitos geralmente são obtidos de ovários coletados em abatedouro e para programas de melhoramento genético os oócitos são aspirados *in vivo* de animais com elevado valor zootécnico.

Quando os ovários são obtidos em abatedouro, devem ser transportados até o laboratório em solução fisiológica (NaCl 0,9%) aquecida entre 30-35 °C e suplementada com antibiótico (100 UI de penicilina e 50 µg de estreptomicina/ml). O período de transporte pode ser de até 3 horas em condições adequadas sem afetar a viabilidade dos oócitos (GONÇALVES et al., 2008). Chegando ao laboratório, os mesmos devem ser lavados em solução fisiológica nas mesmas condições descritas acima e então, submetidos a aspiração folicular com agulha acoplada em uma seringa ou com auxílio de uma bomba de vácuo acoplado a um sistema de aspiração (figura 4) ajustado para aspirar 10 ml por minuto, pressão que não compromete a quantidade, qualidade e viabilidade dos oócitos (GONÇALVES et al., 2014). Outro fator fundamental para o sucesso na maturação, é priorizar a aspiração de folículos com 2-8 mm de diâmetro, ou seja, folículos que estejam na fase anterior à divergência folicular. Acredita-se que oócitos coletados de folículos menores que 2 mm de diâmetro não são capazes de reiniciar a meiose e daqueles acima de 8 mm podem já estar maturados ou entrando em processo de atresia (GONÇALVES et al., 2008).

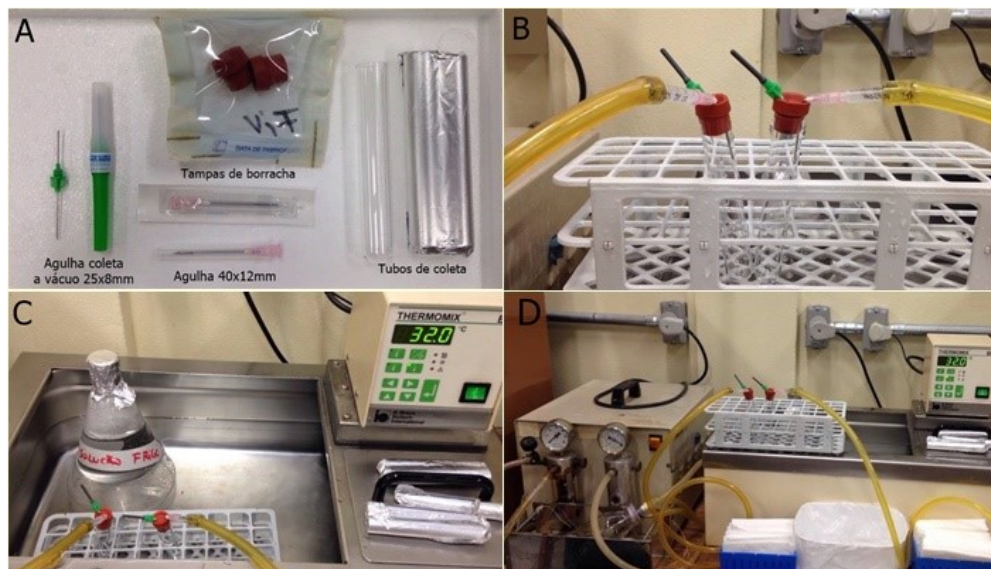


Figura 4: Sistema de aspiração folicular *in vitro*. A) Materiais utilizados para montar o sistema de aspiração folicular. B) Sistema de aspiração folicular preparado e acoplado a mangueiras de silicone que conectam na bomba de vácuo. C) Solução fisiológica (NaCl 0,9%) e tubos para coleta dos oócitos (sistema de aspiração) mantidos em banho maria a 28-35 °C antes da aspiração. D) Sistema de aspiração acoplado em bomba de vácuo. **Fonte:** arquivo pessoal.

Nos casos de aspiração *in vivo*, a colheita dos oócitos é guiada por ultrassonografia transvaginal (OPU), realizada com uma agulha acoplada a um transdutor e ligado a uma bomba de vácuo com pressão regulada a 30 mmHg (GONÇALVES et al., 2008). Os tubos contendo os oócitos e líquido folicular devem ser mantidos aquecidos até chegar ao laboratório.

Após aproximadamente 10 minutos de descanso em banho maria, os oócitos sedimentam e então, o sobrenadante (líquido folicular) deve ser removido. O *pellet* contendo os oócitos é homogeneizado e disposto em uma placa de busca (100 mm de diâmetro). Com auxílio de um esteriomicroscópio, os oócitos são recuperados e transferidos para uma placa de 35 mm contendo líquido folicular centrifugado ou meio de manutenção. Ao término da procura e recuperação dos oócitos, deve ser iniciada a seleção e classificação dos mesmos. A seleção é subjetiva e busca prever a qualidade do complexo *cumulus* oócito, classificando-os em três categorias de acordo com a homogeneidade do citoplasma, o número de camadas e a compactação das células do *cumulus* conforme descrito por Leibfried & First (1979). A figura 5 apresenta oócitos de qualidade 1, 2 e 3.

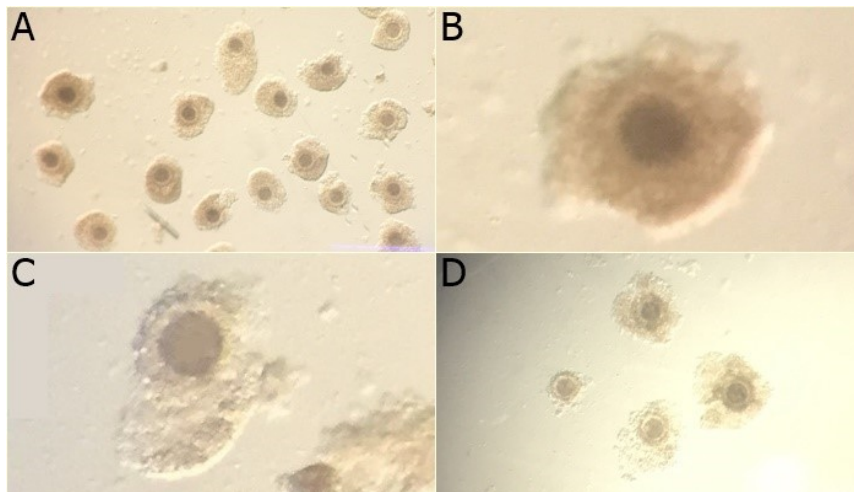


Figura 5: Oócitos classificados de acordo com a qualidade conforme descrito por Leibfried & First (1979). A) Oócitos de qualidade 1 e 2. B) Oócito de qualidade 1 apresentando camada espessa e compacta das células do *cumulus* envolta de todo o ócito e ooplasma homogêneo. C) Oócito de qualidade 2 apresentando camada de células não tão espessa e compacta circundando o oócito, ooplasma homogêneo. D) Oócitos de qualidade 3 apresentando células do *cumulus* expandidas e quase desnudo, ooplasma não homogêneo e com vacúolos. **Fonte:** arquivo pessoal.

A seleção dos oócitos é uma etapa chave para o sucesso na maturação oocitária. A tabela 1 apresenta os parâmetros que devem ser utilizados no momento da seleção segundo o que foi descrito por Gonçalves et al. (2008) adaptado de Leibfried & First (1979). Essa classificação dos oócitos proposta pela primeira vez por Leibfried & First (1979) é amplamente utilizada na PIVE, sendo que, prioriza-se a utilização apenas de oócitos de qualidade 1 e 2, aumentando as chances de obtenção de uma maior taxa de desenvolvimento embrionário, já que possuem uma melhor relação ooplasma-*cumulus*.

Tabela 1: Classificação de acordo com a qualidade de oócitos bovinos, em escala de 1 a 4, considerando as características do *cumulus* e do ooplasma, segundo Gonçalves et al. (2008) adaptado de Leibfried e First (1979).

Qualidade	<i>Cumulus</i> *	Ooplasma**
1	Compacto e presente, com mais de 3 camadas.	Granulações finas e homogêneas, dentro da zona pelúcida de coloração marrom.
2	Compacto e parcialmente presente ou completamente presente com menos de 3 camadas.	Granulações heterogêneas, dentro da zona pelúcida.
3	Presente. Porém, expandido.	Ooplasma contraído, degenerado, vacuolado ou fragementado. Apresenta espaço entre a zona pelúcida e a membrana celular.
4	Sem <i>cumulus</i> .	

*Disposição das células do *cumulus*. **Características do ooplasma.

A qualidade dos oócitos coletados pode ser influenciada por fatores genéticos e ambientais, por isso, é de suma importância considerar alguns parâmetros no momento da coleta e seleção. Durante o outono e inverno é notável a redução na qualidade dos oócitos coletados, a qual pode ser remetida a indisponibilidade de alimento, que é característico nessas épocas do ano pela criação extensiva adotada na maior parte do país. A nutrição inadequada afeta diretamente o metabolismo e a fisiologia animal, conseqüentemente, refletindo no desempenho reprodutivo e qualidade dos gametas (BEAM & BUTLER, 1997). O genótipo da doadora também deve ser considerado, fêmeas *Bos taurus indicus* apresentam uma maior quantidade

de folículos ovarianos recrutados por onda de crescimento folicular (CARVALHO et al., 2008).

Ao término da seleção, os oócitos devem ser lavados em solução de lavagem (TCM-199[®]) e transferidos para uma placa com meio de maturação (composto por TCM-199[®], gonadotrofinas (FSH e LH), fonte de energia, fonte de proteína e antibiótico), que deve proporcionar um ambiente propício para que o oócito consiga sofrer as transformações nucleares, citoplasmáticas e moleculares e se tornar maturo, mimetizando o que ocorre *in vivo*. O oócito bovino precisa de 18 a 22 horas para que consiga realizar a maturação nuclear (GONÇALVES et al., 2008).

Enquanto está dentro do folículo, o núcleo do oócito encontra-se parado em prófase I. Com o pico de LH (maturação *in vivo*) ou a remoção do oócito de dentro do folículo (PINCUS & ENZMANN, 1935), ele retoma a maturação até chegar em metáfase II e extrair o primeiro corpúsculo polar (GONÇALVES et al., 2008). Durante o período de maturação e o início do desenvolvimento embrionário, o oócito vai cessar a transcrição de genes necessários para a sua sobrevivência, dependendo do mRNA produzido e estocado durante o seu desenvolvimento intrafolicular. Segundo HYTTEL et al. (1997), até os seus 100 – 110 µm de diâmetro, o oócito consegue adquirir a competência para se manter durante a maturação e o desenvolvimento embrionário inicial.

Na maturação ocorre também a reorganização das organelas, que é essencial para a adequada atividade transcricional do oócito durante o período de recesso da transcrição de genes (HYTTEL et al., 1997). A maturação do oócito com liberação de alguns fatores associada a ação de hormônios endógenos, estimulam as células do *cumulus* a produzir muco rico em ácido hialurônico, o que resulta na mucificação e expansão das mesmas (GONÇALVES et al., 2008).

A maturação oocitária completa advém de três níveis: maturação meiótica, citoplasmática e molecular. A maturação meiótica é induzida pela remoção do oócito de dentro do folículo ou pelo pico de LH. A maturação citoplasmática é evidenciada pelo recesso nos processos de tradução e transcrição (aos quais o oócito conserva mRNA e proteínas para a sua manutenção nas fases pós-fertilização até que ocorra a ativação do genoma) e pela reorganização das organelas possibilitando a retomada

da meiose. Já a maturação molecular não é bem definida, mas é relacionada com o armazenamento de mRNA específico e proteínas que tornariam o oócito capaz de promover cascatas moleculares necessárias para que ocorra a ativação do genoma embrionário com posterior desenvolvimento embrionário (SIRARD et al., 2006).

Segundo Gonçalves et al. (2008), as taxas de blastocistos obtidos a partir de oócitos maturados e fecundados *in vitro* são inferiores aos obtidos *in vivo*, o que possivelmente é decorrente da maturação oocitária incompleta. Fisiologicamente, o folículo bovino adquire a capacidade ovulatória aos 12 mm de diâmetro (GONÇALVES et al., 2012), a partir desse momento, está apto a receber o pico de LH, aumentando as chances desse oócito conseguir se desenvolver até o estágio de blastocisto (SIRARD et al., 2006). Porém, quando realizada a coleta *in vitro*, são aspirados folículos de 2 a 8 mm de diâmetro, que podem não ter armazenado as quantidades de mRNA e proteínas (maturação molecular e citoplasmática) necessárias para a sua manutenção até que inicie novamente a transcrição (GONÇALVES et al., 2008), fato que ocorre somente após a ativação genômica (MEMILI et al., 2000).

Para a produção de embriões decorrentes de ICSI ou clonagem, a maturação nuclear dos oócitos é avaliada após decorrido o tempo de maturação (18 – 22 horas). Para otimizar a manipulação, são manuseados somente os oócitos que apresentaram expansão das células do *cumulus*, com homogeneidade de ooplasma e extrusão do 1º corpúsculo polar (BORDIGNON, 2011). A avaliação da presença do 1º corpúsculo polar é realizada após a remoção das células do *cumulus* (desnudamento). Após a avaliação e desnudamento, o oócito maturado está apto a ser fecundado pelo gameta masculino ou passar pela transferência nuclear. A figura 6 apresenta um oócito com *cumulus* expandido (A) e um desnudo com extrusão do 1º corpúsculo polar (B).

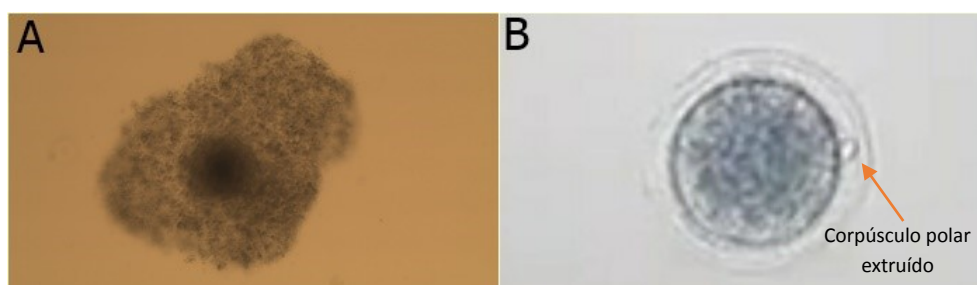


Figura 6: Avaliação da maturação *in vitro* de oócitos bovinos. A) Oócito apresentando expansão das células do *cumulus*. B) Oócito após a remoção das células do *cumulus* evidenciando a extrusão do 1º corpúsculo polar. **Fonte:** arquivo pessoal.

Em síntese, a maturação oocitária é a primeira etapa para a posterior realização das técnicas de ICSI e clonagem por SCNT, desta forma, todos os seus procedimentos devem ser realizados de forma minuciosa e padronizada para a posterior obtenção de sucesso no desenvolvimento embrionário. Ao maturar oócitos deve-se preocupar principalmente com: (1) as variações abruptas de temperatura, as quais reduzem a viabilidade oocitária; (2) a pressão utilizada na bomba de aspiração à vácuo, já que uma pressão maior acaba por lesionar os oócitos durante a coleta e uma pressão inferior não é eficiente para a recuperação dos oócitos, além de aumentar a aspiração de líquido folicular e debris celulares que atrapalham o momento da seleção; (3) a escolha dos folículos a serem aspirados, que devem ser de 2 a 8 mm, visando não aspirar oócitos que ainda não atingiram a maturação molecular (reserva de mRNA e proteínas para a sua manutenção durante o desenvolvimento embrionário inicial) ou aqueles que já estão entrando em processo de atresia; (4) e a classificação dos oócitos, objetivando sempre utilizar oócitos com boa quantidade e disposição das células do *cumulus*, associada a uma boa morfologia ooplasmática.

3.2 INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES EM BOVINOS

A técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) consiste na fecundação do gameta feminino inserindo um único espermatozoide no ooplasma de um oócito maturado (em metáfase II) com auxílio de um micromanipulador. Para a injeção pode ser utilizado o espermatozoide inteiro, apenas a cabeça (núcleo espermático isolado) ou até mesmo células germinativas (espermátides), desde que, apresentem o núcleo com cromossomos haploides (GOTO et al., 1990; MARTINS et al., 2002).

3.2.1 Evolução histórica da ICSI

Existem relatos que a ICSI foi realizada pela primeira vez em ouriços do mar (HIRAMOTO, 1962). Sendo que somente em 1988 obteve-se o primeiro mamífero nascido oriundo da técnica, um coelho (HOSOI et al., 1988). Em humanos foi descrita pela primeira vez por Palermo et al. em 1992, onde propuseram que a ICSI poderia ser uma técnica promissora onde não se tem sucesso com a FIV convencional. Desde então, a ICSI tem sido uma das possíveis soluções para reverter problemas de infertilidade masculina em diversas espécies animais, bem como conseguir maiores taxas de descendentes usando sêmen sexado em bovinos (JO et al., 2014).

Os primeiros trabalhos de ICSI em bovinos começaram a ser descritos por Westhusin et al. (1984), onde foi realizada a injeção de espermatozoides em 200 oócitos provenientes do oviduto ou diretamente dos folículos, divididos em 5 grupos (cada grupo com 20 oócitos coletados de oviduto e 20 de folículos), onde cada grupo recebeu espermatozoides tratados de formas diferentes com o intuito de avaliar se havia a formação de dois pró-núcleos (masculino e feminino). E em 1990 Goto et al., relatou pela primeira vez a clivagem de zigotos, obtenção de blastocistos e posterior obtenção de bezerros oriundos de oócitos bovinos fecundados através de ICSI.

3.2.2 ICSI em bovinos

A ICSI não é uma técnica de reprodução assistida eficiente na espécie bovina, quando comparada a FIV convencional que apresenta resultados satisfatórios (GALLI et al., 2013). Desta forma, a técnica torna-se interessante em episódios onde a FIV convencional não é capaz de produzir embriões com êxito, como é o caso da utilização de sêmen sexado em bovinos leiteiros (JO et al., 2014); de touros geneticamente superiores que não são eficientes na FIV ou inseminação artificial; ou ainda em problemas relacionados a capacidade fecundante dos espermatozoides (TROUNSON et al., 1998). Além disso, é fundamental para a pesquisa científica, relacionada a

estudos de fertilização nas diferentes espécies, disposição de organelas, membrana citoplasmática e seus receptores e rotas fisiológicas de fecundação.

Diferentemente do sucesso da ICSI na reprodução assistida em humanos, existem diversas complicações que resultam na baixa taxa de fertilização em bovinos. Fisiologicamente, com a presença de cálcio (Ca^{2+}) no citosol, o espermatozoide se liga na zona pelúcida do oócito e sofre a reação acrossômica (figura 7), que consiste na fragmentação do acrossoma e a fusão das membranas, liberando enzimas que vão levar a digestão da zona pelúcida, permitindo a penetração do espermatozoide e a liberação do material genético paterno diretamente no citoplasma do oócito. Com a penetração do espermatozoide, ocorre também a ativação do gameta feminino, chamada de reação cortical, que leva ao bloqueio da poliespermia, retomada da meiose, liberação do segundo corpúsculo polar e permite o início das clivagens (GONÇALVES et al., 2008; ALBERTS et al., 2008).

A ativação do gameta feminino é desencadeada pela ligação do espermatozoide na membrana plasmática, aumentando o Ca^{2+} citosólico e consequentemente abrindo canais de Ca^{2+} . O Ca^{2+} se propaga entre as células em forma de ondas oscilantes de Ca^{2+} citosólico que perduram por várias horas, resultando na ativação (ALBERTS et al., 2008). Keefer et al. (1990), concluíram que a injeção do espermatozoide não era suficiente para ativar e desencadear a retomada da meiose dos oócitos bovinos, necessitando de ativação por algum método complementar, onde usaram com êxito o cálcio ionóforo mimetizando o mecanismo fisiológico. Outros métodos artificiais de ativação do oócito serão comentados a seguir no item 3.3.2.3.

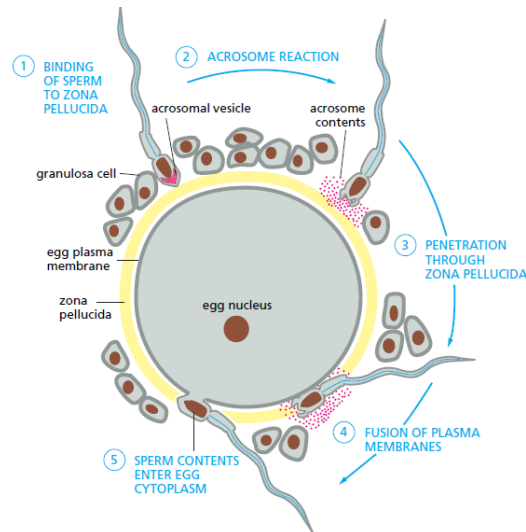


Figura 7: Reação do acrossoma. (1) O espermatozoide se liga na zona pelúcida do oócito desencadeando a (2) reação do acrossoma. (3) Ocorre então, a fragmentação do acrossoma e a liberação de enzimas que digerem a zona pelúcida permitindo a (4) fusão das membranas do oócito e do espermatozoide para a (5) liberação do material genético paterno dentro do ooplasma. **Fonte:** ALBERTS, 2008.

Com a penetração espermática, ocorre o estímulo para que ocorra a segunda divisão meiótica, conseqüentemente, extruindo o segundo corpúsculo polar. Os cromossomos haploides que permaneceram no oócito são envoltos por uma membrana nuclear e formam o pró-núcleo feminino. Ao mesmo tempo deve ocorrer a descondensação da cromatina nuclear do espermatozoide, com a formação de uma nova membrana nuclear que vai envolver os cromossomos, formando o pró-núcleo masculino (GONÇALVES et al., 2008). Os pró-núcleos vão migrar para o centro do ooplasma e se fundir, formando um único núcleo diploide (ALBERTS et al., 2008).

Além da inadequada ativação do oócito, outros problemas comuns da ICSI são a assincronia na formação dos pró-núcleos masculinos e femininos (WEI & FUKUI, 1999), inadequada injeção dos espermatozoides (YANAGIMACHI, 2005) e a falha na descondensação do espermatozoide (LI et al., 1999). A falha na descondensação é bastante comum na ICSI, onde o núcleo do espermatozoide se mantém condensado ou parcialmente condensado, sem desenvolver o pró-núcleo masculino (YANAGIMACHI, 2005).

Durante a espermiogênese, o material genético paterno é altamente condensado por ligações cruzadas de dissulfeto entre moléculas de protamina (GALLI et al., 2003). Fisiologicamente, no momento que o espermatozoide se liga na glicoproteína ZP3 da zona pelúcida, desencadeia a reação do acrossomo, liberando enzimas que digerem a matriz da zona pelúcida, permitindo a liberação do material genético paterno no interior do ooplasma (GONÇALVES et al. 2014). Ao entrar no ooplasma, ocorre o aumento da permeabilidade da membrana espermática associada a ação da glutatona contida no ooplasma, que reduz as ligações cruzadas de dissulfeto das protaminas em sulfidrilas, liberando as protaminas, assim, a cromatina começa a descondensar e forma o pró-núcleo masculino (CARLSON, 2014).

O acrossomo (figura 8) é uma membrana dupla que recobre a maior parte do núcleo (cabeça) do espermatozoide, composto por glicoproteínas e enzimas lisossômicas que permitem a penetração no oócito (REICHENBACH et al., 2008). Na ICSI, ocorre a introdução do acrossomo inteiro no ooplasma, o que dificulta a descondensação do material genético paterno (KIMURA & YANAGIMACHI, 1995). Para resolver esse impasse, alguns tratamentos direcionados ao espermatozoide vem sendo estudados e que podem melhorar os resultados de descondensação, porém a sua eficiência ainda é discutida. Entre eles: eletroporação ou sonificação para a abertura de poros no acrossomo e liberação do material genético (GOTO, 1993); a abertura da membrana espermática pela remoção da cauda do espermatozoide com auxílio da pipeta de microinjeção (YANAGIMACHI, 2005); desestabilização da membrana do espermatozoide através do tratamento com lisolecitina e triton X-100 (ZAMBRANO et al., 2016); e a utilização de um agente redutor de dissulfeto associado com um agente detergente (PERREAULT et al., 1988).

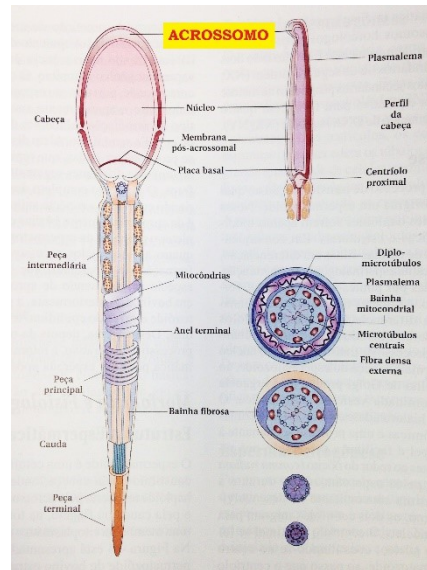


Figura 8: Estrutura de um espermatozoide bovino, dando ênfase ao acrossomo. O acrossomo é uma membrana dupla que recobre a maior parte da cabeça do espermatozoide, composto por glicoproteínas e enzimas lisossômicas. É a estrutura responsável pela penetração do espermatozoide no oócito durante a fecundação. **Fonte:** Reichenbach et al. (2008) adaptado de Schnorr (1989).

3.2.3 Técnica de ICSI segundo protocolo realizado no BioRep

O primeiro passo de uma rotina de ICSI é a maturação de um grupo de oócitos conforme descrito no item 3.1. Aproximadamente seis horas antes do término do período de maturação, deve-se fazer a seleção dos espermatozoides através da técnica de Percoll[®] conforme Gonçalves et al. (2008) e deixá-los em incubadora com atmosfera controlada a 5% de CO₂ em ar, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C até o momento da manipulação. Estudos realizados por Jo et al. (2014), Arias et al. (2014) e Zambrano et al. (2016) também utilizaram o Percoll[®] como método de seleção espermática.

Decorrido o tempo de maturação, deve-se remover as células do *cumulus* com auxílio de hialuronidase e pipetagens sucessivas. Os oócitos totalmente desnudos devem retornar para a placa de maturação até o preparo da placa de manipulação (figura 9) e a montagem do micromanipulador (conforme item 2.1.3).

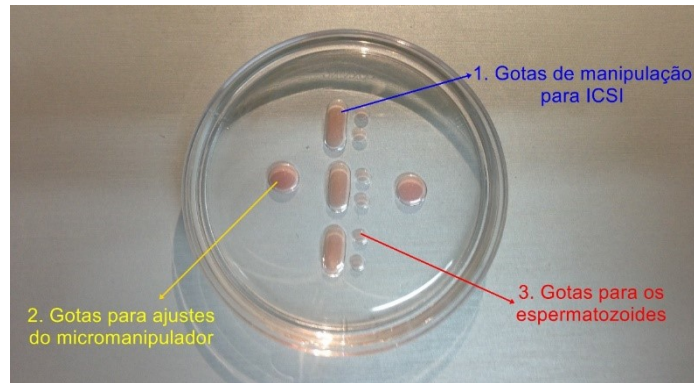


Figura 9: Placa de 60 mm preparada para a manipulação de ICSI, recoberta com óleo mineral. As gotas para manipulação dos oócitos (1) e as de ajuste do micromanipulador (2) são compostas por 60 μ l de meio TCM-199[®] lavagem (conforme descrito por GONÇALVES et al., 2008). Já as gotas para locação dos espermatozoides (3) são compostas por 5 μ l de TCM-199[®] lavagem sem soro fetal bovino acrescido de polivinilpirrolidona (PVP) a 10%. **Fonte:** arquivo pessoal.

Com a placa preparada, deve ser transferido 2 μ l de sêmen para cada gota contendo polivinilpirrolidona (PVP) a 10%, que tem como função reduzir a motilidade e facilitar a manipulação espermática. Previamente a esse momento, podem ser utilizados tratamentos para auxiliar na descondensação do espermatozoide, conforme descrito no item 3.2.2. A metodologia empregada no BioRep é a eletroporação.

O próximo passo é introduzir um grupo de oócitos previamente desnudos na gota a ser realizada a manipulação. Então, iniciar a manipulação: (1) Com auxílio da pipeta de injeção, pegar um espermatozoide na gota de PVP 10% pela cauda (conforme mostrado na figura 10A) e levá-lo até a gota de manipulação. (2) Com a pipeta de manutenção segurar e posicionar um oócito de forma com que o 1^o corpúsculo polar extruído se mantenha na posição “6 ou 12 horas”, assim, evitando lesionar a placa metafásica (figura 10B). (3) Entrar com a pipeta de injeção no ooplasma do oócito na posição “3 horas” (figura 10C). (4) Aspirar parte do citoplasma para romper a membrana citoplasmática (figura 10D). (5) Injetar o espermatozoide com o mínimo de meio. Após a fecundação, os oócitos são transferidos para a parte inferior da gota de manipulação.

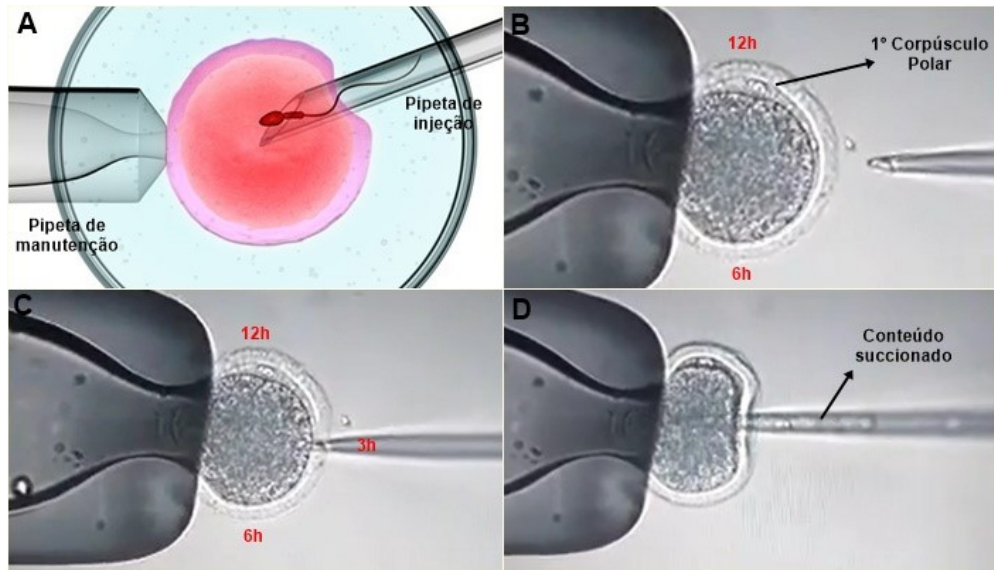


Figura 10: Detalhes de micromanipulação na ICSI. A) O espermatozoide deve ser sugado pela cauda com a pipeta de injeção. B) Com auxílio da pipeta de manutenção, posicionar o corpúsculo polar na posição 6 ou 12h. C) Entrar na posição 3h do oócito com a pipeta de injeção. D) Aspirar parte do citoplasma para romper a membrana plasmática. **Fonte:** A) motherababy.com/Intra-cytoplasmic-sperm-injection-ICSI.html. B-D) Arquivo pessoal.

Ao término da injeção dos espermatozoides, deve-se iniciar o procedimento de ativação do oócito. A ativação é realizada com um cálcio ionóforo, como por exemplo, a ionomicina (5 μM) durante 5 minutos, que vai desencadear um pico de Ca^{2+} capaz de induzir o processo de ativação oocitária. Após a indução da ativação, lavar os zigotos duas a três vezes em TCM-199[®] lavagem e incubá-los em meio de cultivo SOF suplementado com tratamentos específicos de desestabilização do MPF (descritos no item 3.3.2.3) por aproximadamente 4 horas. Atualmente, o BioRep está desenvolvendo pesquisas utilizando dois tratamentos (um ativador da proteína Kinase C e um inibidor da Ciclina dependente de Kinase 1) com o intuito de evitar o reestabelecimento da atividade do MPF. Resultados preliminares vem apresentando taxas de desenvolvimento embrionário semelhantes aos encontrados na literatura, porém, um dos tratamentos utilizados reduziu as chances de obtenção de embriões partenogênicos, frequentemente obtidos quando utilizados os métodos convencionais, como por exemplo o 6-DMAP, os quais podem vir a mascarar os resultados.

Decorrido o tempo de tratamento, os zigotos são transferidos para uma placa contendo meio SOF conforme descrito por Holm et al. (1999). A incubação ocorre em estufa com atmosfera controlada a 5% de CO₂ em ar, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C. A avaliação da clivagem é realizada 48 horas após a manipulação e os zigotos são incubados em atmosfera controlada a 5% de CO₂, 5% O₂ e 90% N₂, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C. A placa deve ser mantida nessas condições até a avaliação do desenvolvimento embrionário no dia 7 após a injeção.

No BioRep, a média de clivagens obtidas na ICSI é de 60% e a taxa de desenvolvimento embrionário é de 15-20%, resultados discrepantes quando comparados com estudos realizados por Jo et al. (2014), que apresentam uma taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário de 92,8% e 28,7%, respectivamente. Porém, os resultados obtidos são semelhantes aos encontrados por Arias et al. (2015) e Zambrano et al. (2016), aos quais obtiveram 64,1% e 51% de clivagem e 22,3% e 21% de taxa de blastocistos, respectivamente. A diferença de resultados encontrados na literatura podem ser relacionadas aos equipamentos e materiais utilizadas pelos diferentes autores e também em decorrência da experiência na realização da técnica.

3.2.4 Aplicações técnicas da ICSI de bovinos

Como descrito anteriormente, a ICSI não é uma técnica de excelência para a reprodução de bovinos. Por esse motivo, torna-se fundamental a ampliação de conhecimento, com o intuito de elucidar os mecanismos fisiológicos e aprimorar a técnica.

Atualmente, a ICSI se torna aplicável na reprodução de bovinos nos casos em que (1) a FIV não é eficiente; (2) por problemas de infertilidade relacionadas ao gameta masculino; (3) com o intuito de preservar a genética de animais que já foram bons reprodutores e que por algum motivo não estão aptos a reprodução; (4) utilização de gametas de machos pré-púberes visando o melhoramento genético e antecipação de geração dos rebanhos pela impressão de características do futuro reprodutor; (5) utilização de oócitos de fêmeas pré-púberes, já que fisiologicamente ainda não

adquiriram a capacidade de bloquear a poliespermia; (6) ampliar a utilização do sêmen sexado; e (7) na pesquisa científica.

Estudos realizados por Jo et al (2014) mostraram o aumento na eficiência da utilização de sêmen sexado por citometria de fluxo quando aplicados na ICSI comparado com FIV convencional. Eles possuíam 4 grupos de estudos, sendo eles: ICSI com sêmen sexado (ssICSI), ICSI com sêmen convencional (csICSI), FIV com sêmen sexado (ssFIV) e FIV com sêmen convencional (csFIV). Os resultados estão apresentados na tabela 2, onde é possível notar o aumento em 22% das taxas de blastocistos obtidas quando foi utilizado o sêmen sexado na ICSI, comparado com a utilização do mesmo sêmen na FIV convencional. Com esses resultados, confere-se a aplicabilidade e importância da ICSI em bovinos.

Tabela 2: Taxas de formação de dois pró-núcleos, clivagem e blastocistos de experimentos realizados por Jo et al (2014) comparando a fecundação através da utilização de sêmen sexado (ss) ou sêmen convencional (cs) nas técnicas de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e fecundação *in vitro* (FIV) convencional.

Grupo	Pró-núcleo* (%)	Clivagem (%)	Blastocisto (%)
ssICSI	75	79,1	24,7
csICSI	73,1	92,8	28,7
ssFIV	23,1	43,6	2,7
csFIV	71,1	71,6	30,2

*Considerada apenas a taxa de formação de dois pró-núcleos.

Fonte: Adaptado de Jo *et al* (2014)

3.3 CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM BOVINOS

A clonagem por transferência nuclear de célula somática (SCNT) é uma técnica que consiste na utilização de um citoplasto, onde seu núcleo é substituído por uma

célula somática, tendo como função reprogramar o núcleo doador e produzir um organismo geneticamente idêntico ao qual derivou o material nuclear. Para isso, é necessário um oócito maturado em metáfase II, apresentando a extrusão do primeiro corpúsculo polar, que servirá de referência para identificar o núcleo da célula receptora (contendo a cromatina) e removê-lo através de micromanipulação. A maturação dos oócitos para SCNT que servirão de citoplasto pode ser realizada de duas maneiras: *in vitro* (conforme descrito no item 3.1) ou coleta-lo já maturo *in vivo*.

O método de maturação *in vitro* se torna mais conveniente para a SCNT em bovinos pela facilidade de obtenção de ovários em abatedouro, principalmente quando relacionado à pesquisa científica. Porém, em outra perspectiva, oócitos maturados *in vivo* podem aumentar as taxas de sucesso da técnica, já que remove-se a porcentagem de erro na utilização de oócitos imaturos devido as razões já discutidas anteriormente no item 3.1 desse trabalho.

3.3.1 Evolução histórica da SCNT

Existem relatos de que as primeiras ideias relacionadas com a técnica de transferência nuclear foram realizadas em anfíbios e partiram de estudos de Spemann em 1914 (BORDIGNON, 2014; ROSS & FELTRIN, 2014). Porém, somente em 1952 se obteve o primeiro relato de clivagem (53%) e desenvolvimento embrionário normal (30%) após a técnica de transferência nuclear em rãs da mesma espécie por Briggs & King (1952), os quais utilizaram agulhas para dissecar o núcleo das células doadoras (blastocistos) e injetá-los nos citoplastos.

O primeiro relato de sucesso na transferência nuclear de mamíferos foram descritos por Illmensee & Hoppe (1981) e é bastante contestado no meio científico, já que até a atualidade nenhum outro grupo de pesquisa conseguiu replicar o experimento, ao qual usaram zigotos em estágio pronuclear como célula receptora, além de que, já foi comprovado que esse tipo de célula não induz a correta reprogramação nuclear (BORDIGNON, 2014). Em 1986 Willadsen teve sucesso injetando o blastômero de um embrião de 8 células em um citoplasto de um oócito não

fertilizado, obtendo o nascimento de um cordeiro Suffolk híbrido (WILLADSEN, 1986). Após a descrição do método usado por Willadsen, diversos pesquisadores aplicaram a técnica nas outras espécies animais obtendo sucesso.

Em 1996 Campbell et al. relataram com sucesso a utilização de uma linhagem de células de animais adultos na transferência nuclear para um oócito em metáfase II, seguido de eletrofusão, obtendo o desenvolvimento embrionário, uma outra visão do que já havia sido exposto. No ano seguinte, Wilmut et al., (1997) publicaram o nascimento do primeiro cordeiro oriundo de uma linhagem de células de glândula mamária adulta, a famosa Dolly. Após o nascimento de Dolly, várias outras espécies animais foram clonadas, superando o dogma científico até então sustentado, ao qual não acreditava-se na capacidade de uma célula adulta ser reprogramada a ponto de desenvolver descendentes.

3.3.2 SCNT em bovinos

Os estudos iniciais de SCNT realizados em bovinos, tinham como objetivo a multiplicação de animais com elevada performance na produção de leite (KENT-FIRST et al., 2014). As taxas obtidas com a produção *in vitro* de embriões por SCNT são bastante semelhantes às aquelas obtidas com a FIV convencional (AGAKI et al., 2013). Experimentos realizados por Xiong et al. (2012) compararam a PIVE através de FIV convencional e SCNT, obtendo 67,6% e 56,7% de clivagem e 30,6% e 20,2% de desenvolvimento embrionário, respectivamente. Porém, após a transferência para as receptoras, as taxas de desenvolvimento dos embriões SCNT se torna muito baixa, associada a exacerbadas perdas embrionárias e fetais, elevado peso ao nascimento e morte pós-natal (AGAKI et al., 2013). Após transferir 89 embriões SCNT para receptoras, Wang et al. (2011) obtiveram a taxa de apenas 6,7% de bezerros nascidos.

Uma revisão de dados a respeito de características da SCNT realizada por Bordignon (2011), apresentou que apenas 0-7% dos oócitos que passam pela transferência nuclear são capazes de dar origem a indivíduos nascidos vivos. Destes,

aproximadamente 40% apresentam problemas relacionados com malformações placentárias e fetais, onde destaca-se o aumento do peso ao nascimento, conhecida como a síndrome do bezerro grande (*LOS – Large Offspring Syndrome*).

Mesmo com vários estudos para tentar aprimorar a SCNT, a baixa eficiência da técnica é relacionada a defeitos epigenéticos, incluindo as falhas na ativação do oócito que acaba condensando ou fragmentando a cromatina e a incompleta reprogramação nuclear por diferenças na coordenação dos ciclos celulares da célula doadora e citoplasto. Esses fatores vão predispor as clivagens celulares atípicas e a diferenciação de forma aberrante das células. Por isso, torna-se típico o nascimento de “monstros” ou bezerros com problemas cardíacos e respiratórios, quando se usa a técnica de SCNT (BORDIGNON, 2011).

3.3.2.1 Reprogramação Nuclear

A reprogramação nuclear corresponde ao processo pelo qual o núcleo de uma célula somática é transformado em um embrião (ROSS & FELTRIN, 2014). Após a SCNT é iniciado o processo de reprogramação nuclear, onde o citoplasma do oócito e a célula somática começam a interagir, o que leva a alterações da estrutura da cromatina deixando-a pluripotente. O reestabelecimento da pluripotência é um evento chave para o início do desenvolvimento embrionário e que ainda não é totalmente compreendido (RYBOUCHKIN et al., 2006).

O processo de reprogramação celular é controlado por eventos epigenéticos, incluindo a acetilação das histonas. Os fatores de transcrição que atuam no DNA, dependem da estrutura da cromatina local. Quando a cromatina encontra-se bastante compactada pela ação das histonas, acaba por inibir a transcrição gênica pois não permite o acesso para que ocorram as transcrições necessárias. Por isso, é essencial que ocorra a acetilação das histonas, tornando a cromatina “relaxada” e acessível para que ocorra o aumento da expressão gênica (SARAIVA et al., 2010).

Porém, a reprogramação de um núcleo de uma célula somática diferenciada em um embrião totipotente através da transferência para um citoplasto não é eficiente

(RYBOUCHKIN et al., 2006). Com o intuito de auxiliar na acetilação das histonas, alguns agentes químicos vem sendo usados antes ou após a transferência nuclear, tentando melhorar a capacidade de reprogramação celular. São eles: a tricostatina A, a azacitidina e o *Scriptaid*.

A tricostatina A (TSA) é um antifúngico, que quando usado em cultivo de células é capaz de diferenciá-las, proporcionando a hiperacetilação de histonas, já que inibe enzimas histona deacetilases de forma específica (YOSHIDA et al., 1990). RYBOUCHKIN et al. (2006), demonstraram que a utilização de TSA (100 nM) após a transferência nuclear aumentou em aproximadamente 40% a taxa de blastocistos, quando comparado com o grupo sem tratamento (81% com TSA e 40% sem tratamento).

O *Scriptaid* também é um inibidor de histonas deacetilases de baixa toxicidade que aumenta a atividade transcricional e a expressão de proteínas (SU et al., 2000). Em estudos realizados por SU et al. (2000), o uso de *Scriptaid* (2 – 2,5 µg/ml) resultou no aumento em cem vezes da acetilação das histonas, o que foi considerado como menos tóxico que os demais compostos utilizados, já que a concentração eficiente é menor. Wang et al. (2011) apresentaram o aumento de 15% na taxa de desenvolvimento embrionário por SCNT utilizando *Scriptaid* (500 nM), comparado com o grupo controle (37% e 22%, respectivamente).

Já a azacitidina ou 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) é um inibidor de DNA metiltransferases (enzimas que metilam o DNA; TSUJI et al., 2009). A metilação do DNA é associada com o silenciamento de genes através da ligação de proteínas ao DNA, interferindo na expressão gênica (INBAR-FEIGENBERG et al., 2013). Porém, a sua utilização mostrou-se tóxica, reduzindo as taxas de blastocistos em estudos realizados por Tsuji et al. (2009), não alterando os níveis de metilação de DNA dos embriões SCNT comparados ao grupo controle.

3.3.2.2 Relação citoplasto x Núcleo doador

Para a SCNT, é importante ter uma coordenação entre os ciclos celulares do oócito receptor e do núcleo doador (WILMUT et al., 2002). Onde a célula somática doadora preferencialmente deve estar na fase G0 do ciclo celular, ou seja, que não cessou a sua divisão, mas ainda ativamente se dividindo, o que indica que ela está em um estado indiferenciado, tornando-a capaz de se tornar compatível com o citoplasto (em metáfase II) e dar origem a um embrião (CIBELLI et al., 1998; WILMUT et al., 2002).

3.3.2.3 Ativação Oocitária

Como citado anteriormente (item 3.2.2), a ativação do gameta feminino é desencadeada pela ligação do espermatozoide na membrana plasmática do oócito, que inicia uma série de acontecimentos intracelulares resultando na clivagem do zigoto. No caso da SCNT, semelhante com o que acontece na ICSI, não ocorre o estímulo necessário para desencadear a ativação fisiológica do oócito, sendo necessária a utilização de métodos artificiais de ativação.

Existem vários protocolos de ativação artificial para oócitos de mamíferos, onde todos eles induzem a retomada da meiose, pela mimetização das respostas que seriam causadas pela ligação do espermatozoide (WAKAI et al., 2014). Os métodos de ativação mais usados compreendem a exposição a ionóforos de cálcio (ionomicina e A23187). Outros protocolos descritos relatam a utilização de etanol, cloreto de estrôncio (SrCl_2), silicato de mercúrio (timerosal), acetilcolina, adenofostina A, inositol trifosfato (IP_3) e pulsos elétricos com presença de cálcio extracelular (WAKAI et al., 2014). Em bovinos, é amplamente utilizado ionóforos de cálcio associado a um inibidor de quinase para a ativação dos oócitos.

A exposição a ionóforos leva a um único e persistente pico de cálcio, o que pode ser insuficiente para induzir a ativação do oócito e a retomada da meiose (WAKAI

et al., 2014). Fisiologicamente, o reinício da meiose oocitária é induzida pela ligação do espermatozoide na zona pelúcida do oócito, que resulta em oscilações de longa duração que degradam Ciclina B, a qual é responsável por regular o fator promotor de maturação (MPF; BORDIGNON, 2011). Desta forma, a ativação por ionóforos deve ser combinada com compostos capazes de manter baixos os níveis de MPF e MAPK (proteína-quinases ativadas por mitógenos; WAKAI et al., 2014), já que os mesmos são responsáveis pela retenção da maturação em metáfase II (BORDIGNON, 2011).

Para inativar a ação dos ionóforos são usados compostos inibidores da síntese de proteína, de polimerização de filamentos de actina e inibidores de quinases durante algumas horas após a ativação, como a cicloheximida (CHX), a citocalasina B (CB) e a 6-dimetilaminopurina (6-DMAP; WAKAI et al., 2014), respectivamente. Esses agentes evitam que a atividade do MPF seja reestabelecida o que conseqüentemente, bloquearia o desenvolvimento embrionário (BORDIGNON, 2014). Porém, esses agentes inibem a extrusão do segundo corpúsculo polar, o que poderia mascarar os resultados, já que através desse procedimento se pode obter embriões partenogênicos.

3.3.3 Técnica de SCNT segundo protocolo realizado no BioRep

O primeiro passo para uma rotina de SCNT no BioRep é cultivar em estufa a 37 °C as células somáticas oriundas de linhagens de fibroblastos fetais de epiderme de bovinos coletados em frigorífico. As células doadoras de núcleo podem ser obtidas de diferentes tecidos, não tendo sido determinado qual o tipo celular mais adequado (BORDIGNON, 2014). O cultivo inicia aproximadamente quatro dias antes do procedimento de SCNT para dar o tempo necessário para que as células adquiram confluência.

No dia anterior a manipulação, um grupo de oócitos é submetido à maturação, conforme descrito no item 3.1. Decorrido o tempo de maturação, deve-se remover as células do *cumulus* com auxílio de hialuronidase e pipetagens sucessivas. Os oócitos totalmente desnudos devem retornar para a placa de maturação até o preparo da

placa de manipulação para SCNT (figura 11) e a realização dos ajustes necessários no micromanipulador (2.1.3).



Figura 11: Placa de 60 mm preparada para a manipulação de SCNT, recoberta com óleo mineral. As gotas para a manipulação (1) possuem formato de “H”, onde em uma das “pernas do H” vai o grupo de oócitos maturados com as células somáticas, na outra são dispostos os oócitos após a micromanipulação e a transferência nuclear ocorre na região central do “H”. As gotas de manipulação (1) e as de ajustes do microscópio (2) são compostas por meio TCM-199® lavagem (conforme descrito em GONÇALVES *et al.*, 2008) acrescido de Citocalasina, composto que desestabiliza a zona pelúcida e facilita a micromanipulação. **Fonte:** arquivo pessoal.

Na clonagem por SCNT torna-se necessária a enucleação do oócito, ou seja, a remoção da placa metafásica, a qual será substituída por um célula somática. Para isso, o protocolo mais usado é a enucleação mecânica por aspiração do citoplasma, utilizando o 1º corpúsculo polar como referência da localização do núcleo. A enucleação deve ser realizada em meio tamponado com Hapes e suplementado com Citocalasina B (2,5 – 10 µg/ml), que previne a lise do oócito proporcionando uma maior elasticidade ao mesmo (BORDIGNON, 2011).

Outros protocolos de enucleação são propostos na literatura, como por exemplo: (1) a exposição dos oócitos a fluoróchromos específicos de DNA (Hoechst 2 – 10 µg/ml durante 5 – 10 minutos) com posterior exposição a fluorescência. Porém, a exposição a fluorescência pode ser prejudicial para a viabilidade dos oócitos, além de remover

uma grande parte do ooplasma. O sucesso de enucleação com essa técnica se aproxima dos 70%. (2) Um segundo método é conhecido como enucleação de telófase, no qual a enucleação é realizada após 1-3 horas da ativação, aspirando o segundo corpúsculo polar, já que nessa fase a cromatina o acompanha. A vantagem dessa técnica é a utilização de apenas oócitos capazes de completar a meiose. (3) Outra técnica descrita é a *The Handmade Cloning* (HMC, técnica de clonagem manual) a qual os micromanipuladores são substituídos pela utilização de microlâminas, possibilitando o desenvolvimento da técnica em laboratórios que não dispõem de micromanipuladores e microscópios invertidos de fluorescência. (4) O tratamento dos oócitos com demecolcina (0,4 µg/ml) e sacarose (0,05 M) também é amplamente utilizado na SCNT, consiste na incubação dos oócitos maturados durante 1 – 2 horas antes da enucleação (BORDIGNON, 2011; BORDIGNON, 2014).

No BioRep é utilizada a técnica de exposição dos oócitos a demecolcina (0,4 µg/ml) e sacarose (0,05 M) durante aproximadamente 1 hora antes da enucleação. Esse procedimento promove uma protusão na membrana ooplasmática denominada de pseudocorpúsculo polar, o qual contém a cromatina que deseja-se remover (BORDIGNON, 2011). Esse procedimento é considerado bastante vantajoso na clonagem por SCNT, já que estudos demonstram que a utilização de citoplastos em metáfase II proporcionam uma melhor reprogramação nuclear (BORDIGNON, 2014).

Com a placa montada, devem ser transferidos os grupos de oócitos e células somáticas para as gotas de micromanipulação e iniciar o procedimento. Para a enucleação é necessário um grande número de oócitos de boa qualidade maturados em metáfase II (GALLI et al., 2014). Ao contrário do que ocorre na ICSI, onde prézasse manter a placa metafásica, na SCNT ela é substituída por uma célula somática. Desta forma, com auxílio da ponteira de manutenção, o corpúsculo polar é posicionado aproximadamente na posição 4 horas (figura 12A), a ponteira de injeção penetra a zona pelúcida na posição 4 horas e aspira aproximadamente 10% de citoplasma abaixo do corpúsculo polar (WOLF et al., 2001), removendo a placa metafásica (figura 12B) e obtendo um citoplasto (figura 12C). Então, uma célula somática é succionada com a ponteira de injeção (figura 12D) e injetada no ooplasma do oócito (figura 12E).

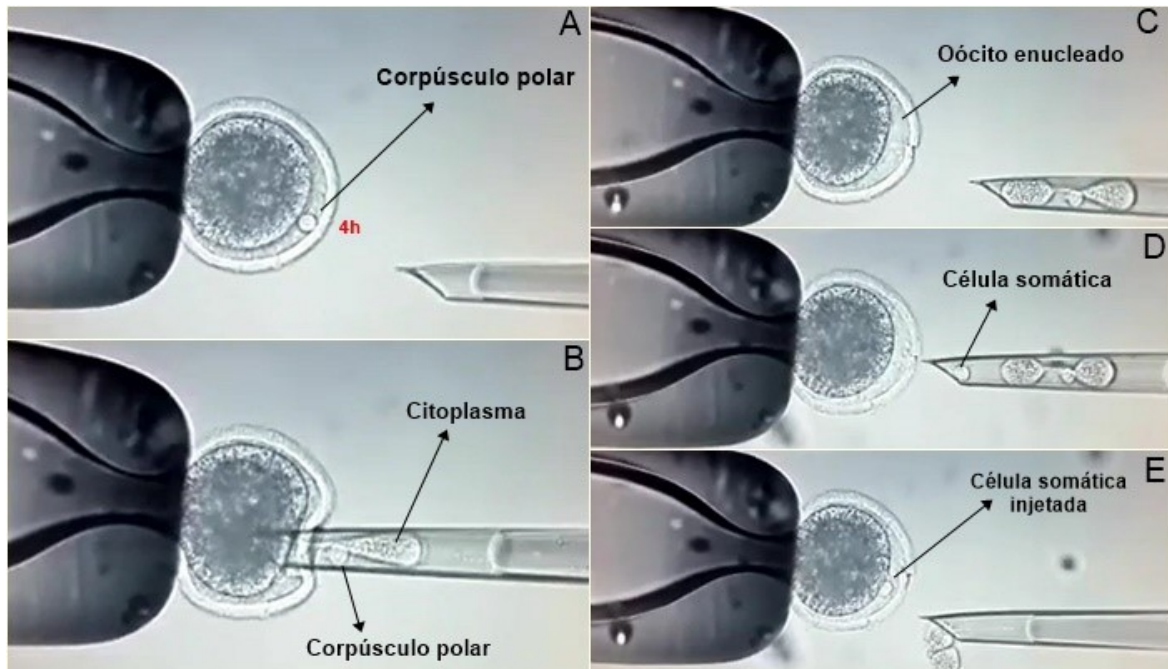


Figura 12: Detalhes da micromanipulação de clonagem por SCNT. A) O oócito maturado deve estar posicionado de forma com que o corpúsculo polar se apresente aproximadamente às 4 horas. B) Com auxílio da ponteira de injeção, perfurar a zona pelúcida e remover o corpúsculo polar e aproximadamente 10% do ooplasma (contendo o núcleo), (C) obtendo um oócito enucleado (citoplasto). D) Com a ponteira de injeção, coletar uma célula somática e injetá-la no citoplasto. E) Citoplasto com o núcleo doador. **Fonte:** arquivo pessoal.

Ao término da manipulação, os oócitos e células submetidas à SCNT passam por um processo para auxiliar na fusão da célula transferida no citoplasto. Existem diversos protocolos de fusão, entre eles: eletrofusão, eletroporação, utilização de vesículas lipídicas, polietilenoglicol ou com um vírus inativado (Sendai; BORDIGNON, 2014). No BioRep é utilizada a eletrofusão, na qual o núcleo doador e o citoplasto são alinhados manualmente de forma com que fiquem paralelos aos eletrodos e então, dado um pulso de corrente direta, com voltagem de 32 V e duração de 70 μ s. Através dos poros nas membranas que a corrente direta causa, induz a fusão do núcleo doador com o citoplasto (BORDIGNON, 2014).

Após a fusão, os clones são levados para a estufa com atmosfera controlada a 5% de CO₂ em ar, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C por uma hora. Decorrido esse tempo, é realizado o procedimento de ativação química dos oócitos com um cálcio ionóforo, como por exemplo, a ionomicina (5 μ M) durante 5 minutos,

que vai desencadear um pico de Ca^{2+} capaz de ativar os oócitos. Após os cinco minutos em contato com o cálcio ionóforo, os zigotos devem ser lavados duas vezes em TCM-199® (meio de lavagem) e colocados em meio contendo um composto inibidor da síntese de proteína (CHX) ou de quinases (6-DMAP) por aproximadamente 6 horas após a ativação.

Atualmente, o BioRep está desenvolvendo pesquisas com a utilização de agentes comumente empregados nas etapas de clonagem por SCNT associados com um agente inibidor de transcrição. Resultados preliminares vem apresentando que a associação de *Scriptaid* com o inibidor de transcrição, resultou na melhora na reprogramação celular de embriões bovinos, com consequente aumento na taxa de desenvolvimento embrionário e número de células dos embriões produzidos. Porém, o mesmo tratamento utilizado na reclonagem (15 horas após a fusão) não teve diferença quando comparado com o grupo controle.

Após a ativação, os zigotos são incubados em meio SOF (conforme descrito em GONÇALVES et al., 2008) em estufa com atmosfera controlada a 5% de CO_2 em ar, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C. A clivagem é avaliada 48 horas após a manipulação e os embriões clones são incubados em atmosfera controlada a 5% de CO_2 , 5% O_2 e 90% N_2 , umidade saturada e temperatura de 38,5 °C. A placa deve ser mantida nessas condições até a avaliação do desenvolvimento embrionário no dia 7 após transferência nuclear.

No BioRep, a média de clivagens obtidas na clonagem por SCNT é de 70% e a taxa de desenvolvimento de embriões é de 30%. Em condições semelhantes de cultivo, Wang et al. (2011a) obtiveram 86,3% de clivagem e 40,2% de desenvolvimento embrionário. Já Xiong et al. (2012), relataram 56,7% e 20,2% de taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário, respectivamente. Como a diferença entre as taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário obtidas entre os autores não foi discrepante, sugere-se que pode ser em decorrência de condições de manipulação díspares, qualidade dos complexos *cumulus-oócito* utilizados e experiência do manipulador.

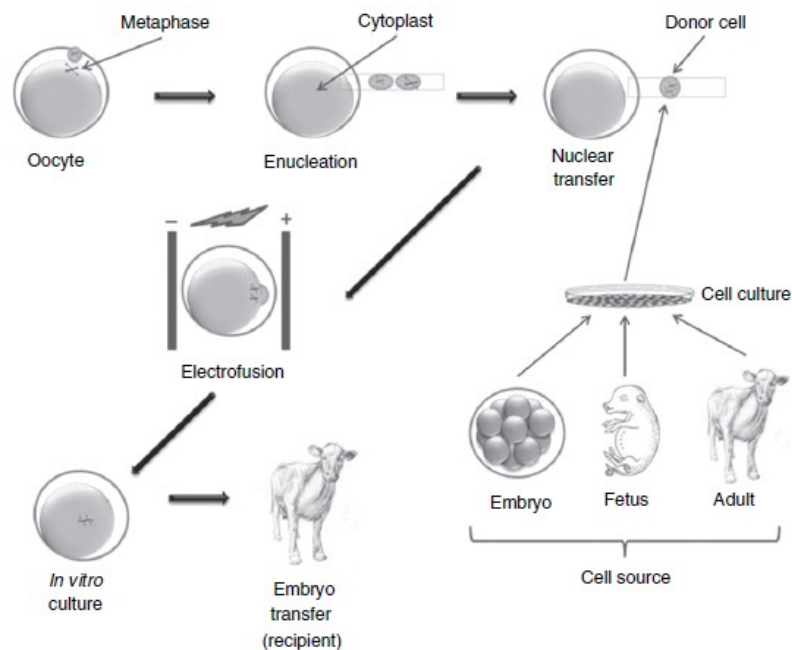


Figura 13: Esquematização da técnica de clonagem por transferência nuclear de célula somática (SCNT). Para a SCNT, são necessários oócitos em metáfase II do ciclo celular, que é evidenciada pela extrusão do primeiro corpúsculo polar. Utilizando o corpúsculo polar como indicador de proximidade do núcleo, o núcleo é removido, obtendo um citoplasto (oócito enucleado). Uma célula somática oriunda de um embrião, feto ou animal adulto e cultivada em laboratório, é injetada dentro do citoplasto (transferência nuclear). Então, o clone é submetido a um processo de eletrofusão para auxiliar na fusão do núcleo doador e do citoplasto. Nesse momento, pode ser realizada também uma ativação com agentes químicos que são capazes de induzir a ativação do oócito que é prejudicada no procedimento de SCNT. Após a fusão e ativação, o oócito é submetido a cultivo *in vitro* até o momento da transferência para a receptora. **Fonte:** Ross & Feltrin (2014).

3.3.4 Aplicações técnicas da clonagem por SCNT em bovinos

Os principais interesses no uso da SCNT estão relacionados com a replicação idêntica de animais de produção mantendo características almejadas; obtenção de uma cópia idêntica de um animal de estimação; replicação de espécies ameaçadas de extinção; utilização da genética de um animal que veio a óbito; e produção de animais transgênicos (BORDIGNON, 2011).

Certamente, a SCNT em bovinos tem como principal objetivo manter as características genéticas desejadas, utilizando animais com valor zootécnico elevado e já conhecido. Com isso, veio a incerteza da segurança da carne e do leite oriundos de animais clonados e de seus descendentes para o consumo humano, devido falta de conhecimento a respeito das falhas de reprogramação epigenéticas e a insegurança dos genes envolvidos (RUDENKO et al., 2007). A partir daí, vários países se empenharam em estudos para elucidar esse paradigma e concluíram que o consumo dos mesmos é garantido (ROSS & FELTRIN, 2014).

4 CONCLUSÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia da reprodução assistida amplamente utilizada e desenvolvida em bovinos. A PIVE convencional é bastante eficiente nessa espécie, porém, em algumas situações ela não é capaz de prover descendentes, necessitando da utilização de biotecnologias complementares, como a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

A ICSI tornou possível a produção *in vitro* de embriões utilizando machos com valor zootécnico de interesse que já foram férteis, mas por alguma eventualidade não possuam mais capacidade fecundante *in vivo*. Ou até mesmo, a utilização do sêmen de machos que não possuem sucesso na fecundação *in vitro* (FIV) convencional. Embora ainda não tenha se tornado uma técnica de excelência na PIVE de bovinos, a ICSI é uma biotecnologia amplamente utilizada na reprodução assistida de humanos, que proporcionou a resolução da infertilidade masculina. Por isso, torna-se fundamental a realização de estudos aplicados visando o aprimoramento da técnica, trazendo no futuro resultados satisfatórios ou até mesmo melhorando as atuais taxas de desenvolvimento obtidas.

De outro lado, a clonagem por SCNT é uma biotecnologia que proporciona uma cópia genética de um animal de interesse. Embora a sua utilização em humanos seja bastante questionada e bloqueada pelos comitês de ética, ela traz para a produção animal a capacidade de obtenção de uma cópia idêntica de um animal desejado, seja pela sua genética ou por ter valor sentimental ao proprietário. Mas, ainda não se obtém uma boa taxa de animais nascidos vivos, o que é bastante relacionado a enigmas epigenéticos ocorridos durante o desenvolvimento embrionário inicial.

Com o advento dessas novas biotecnologias tornou-se possível resolver alguns dos impasses encontrados em situações-chaves da PIVE convencional. Porém, muitos aspectos práticos ainda precisam ser conhecidos visando aprimorar as técnicas e obter a melhoria das taxas de sucesso. Nesse contexto, os estudos nas pesquisas básica e avançada tornam-se ícones essenciais para a elucidação e resolução dos atuais impasses encontrados na utilização das mesmas.

Ter a oportunidade de acompanhar a rotina e experimentos de um laboratório que desenvolve as técnicas de ICSI e SCNT, foi essencial para a formação acadêmica, desenvolvimento de conhecimento específico e científico, e conseqüentemente, ímpar para a escolha profissional. A revisão da literatura associada com as práticas acompanhadas, estimularam diariamente a necessidade de obtenção de mais conhecimento. A cada leitura realizada para compor esse trabalho, inúmeros questionamentos científicos foram estimulados, juntamente com a imensa pretensão de aprimorar essas técnicas de micromanipulação para no futuro auxiliar o meio científico a elucidar esses impasses.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAKI S., GESHI M. e NAGAI T. **Recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer**. Tsukuba: Animal Science Journal, 2013.
- ALBERTS B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; et al. **Sexual Reproduction: Meiosis, Germ Cells and Fertilization**. In: __Molecular Biology of The Cell. 5. ed. Garland Science - Taylor & Francis Group, 2008.
- ARIAS, M. E.; SÁNCHEZ, R.; RISOPATRÓN, J.; et al. **Effect of sperm pretreatment with sodium hydroxide and dithiothreitol on the efficiency of bovine intracytoplasmic sperm injection**. Montevideo, 2013.
- BEAM, S. W. & BUTLER, W. R. **Energy Balance and Ovarian Follicle Development Prior to the First Ovulation Postpartum in Dairy Cows Receiving Three Levels of Dietary Fat**. Biology of Reproduction 56. 1997. P. 133-142.
- BERTOLINI, M. & BERTOLINI, L. R. **Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning**. Med. Vet. Zoot., 2009. P. 184-194.
- BORDIGNON, V. **Animal Cloning: State of the Art and Applications**. In: __ Animal Systems. Elsevier, 2011.
- BORDIGNON, V. **Clonagem animal por transferência nuclear**. In: GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R. e FREITAS, V. J. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: Roca, 2014.
- BRACKETT, R. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L. et al. **Normal development following in vitro fertilization in the cow**. Biol. Reprod. 27. 1982. P. 147-158.
- BRIGGS, R. & KING, T. J. **Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs**. Zoology 38. Philadelphia, 1952.
- CAMPBELL, K. H. S.; McWHIR, J.; RITCHIE, W. A.; et al. **Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line**. Nature 380. Edimburgo, 1996.
- CARLSON, B. M. **Embriologia humana e biologia do desenvolvimento**. 5 ed. Elsevier, 2014. P. 520.
- CARVALHO, J. P. B.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; et al. **Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers**. Theriogenology 69. Elsevier, 2008. P. 167-175.
- CHANG, M. C. **Fertilization of rabbit ova in vitro**. Nature 184. 1959. P. 466-467.
- CIBELLI, J. B.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; et al. **Cloned Transgenic Calves Produced from Nonquiescent Fetal Fibroblasts**. Science 280. 1998.
- DUCIBELLA, T.; HUNEAU, D.; ANGELICHIO, E.; et al. **Egg-t-embryo transition is driven by Differential responses to Ca²⁺ oscillation number**. Developmental Biology 250. Boston, 2002. P. 280-291.

- GALLI, C.; VASSILIEV, I.; LAGUTINA, I.; et al. **Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol**. Theriogenology 60. Elsevier, 2003.
- GALLI, C.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; et al. **Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice**. Theriogenology 81. 2014. P. 138-151.
- GONÇALVES, P. B. D.; GASPERIN, B. G.; FREITAS, R.; et al. **Control of ovulation in mammals**. Animal Reproduction 9. 2012. P. 354-361.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. & FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ed. São Paulo: Roca, 2014.
- GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L. & MEZZALIRA, A. et al. **Produção in vitro de embriões**. In: GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R. e FREITAS, V. J. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. 2ed. São Paulo: Roca, 2008.
- GOTO, K.; KINOSHITA, A.; TAKUMA, Y.; et al. **Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa**. Vet. Rec.127. 1990. P. 517-520.
- GOTO, K. **Bovine Microfertilization and Embryo Transfer**. Molecular Reproduction and Development 36. Kogoshima, 1993. P. 288-290.
- HIRAMOTO, Y. **Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs**. Experimental Cell Research 27. Japan, 1962. P. 416-426.
- HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; et al. **High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins**. Theriogenology 52. Elsevier, 1999. P. 683-700.
- HOSOI, Y.; MIYAKE, M.; UTSUMI, K.; et al. **Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoon**. Vol. 3. 1988. P. 331-333.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; et al. **Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle**. Theriogenology 47. Elsevier Science Inc, 1997. P. 23-32.
- IETS. **2014 Statistics of Embryo Collection and transfer in domestic farm animals**. Disponível em: http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2015.pdf. Acessado em: 06 de junho de 2017.
- ILLMENSEE, K. & HOPPE, P.C. **Nuclear transplantation in Mus musculus: Developmental Potential of Nuclei from Preimplantation Embryos**. Cell 23. Geneva: Copyright, 1981. P. 9-18.
- INBAR-FEIGENBERG, M.; CHOUFANI, S.; BUTCHER, D. T.; et al. **Basic concepts of epigenetics**. Fertility and Sterility 99. 3 ed. Ontario, 2013.
- JO, H. T.; BANG, J. I.; KIM, S. S. et al. **Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: Efficiency and in vitro developmental competence**. Theriogenology 81. 2014. P. 675-682.
- KEEFER, C. L. **Artificial cloning of domestic animals**. 29 ed. Vol. 112. 2015.

- KEEFER, C. L.; YOUNIS, A. I. & BRACKETT, B. G. **Cleavage development of bovine oocytes fertilized by sperm injection.** *Molecular Reproduction and Development* 25. Georgia, 1990. P. 281-285.
- KENT-FIRST, M.; BEYHAN, Z.; AMBROGGIO, J.; et al. **A historical Perspective of the Cloning in Cattle.** In: CIBELLI, J.; GURDON, J.; WILMUT, I. et al. *Principles of Cloning.* Elsevier, 2014.
- KIMURA, Y. & YANAGIMACHI, R. **Intracytoplasmic sperm injection in the mouse.** *Biology of Reproduction* 52. 1995. P. 709-720.
- KISHIGAMI, S.; NGUYEN, V. T.; WAKAYAMA, S.; et al. **Enhancing SCNT with Chromatin Remodeling Agents.** In: IBELLI, J.; WILMUT, I. S.; JAENISCH, R. et al. *Principles of Cloning.* 2013.
- KISHIGAMI, S.; WAKAYAMA, S.; THUAN, N. V.; et al. **Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer.** *Nature Protocols.* 2006. P. 125-138.
- LEIBFRIED, L. & FIRST, N. L. **Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature In Vitro.** *Journal of Animal Science* 48. Madison, 1979.
- LI, X.; HAMANO, K. I.; QIAN, X.; et al. **Oocyte activation and parthenogenetic development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection.** *Zygote* 7. Maebashi: Cambridge University Press, 1999. P. 233-237.
- MALTER, H. E. **Micromanipulation in assisted reproductive technology.** *Reproductive BioMedicine Online.* Greenville: Elsevier, 2016.
- MARTINS, C. F.; SILVA, A. E. D. F.; e RUMPF, R. **Injeção Intracitoplasmática de células espermáticas e suas aplicações na reprodução dos bovinos.** Brasília: Embrapa, 2002.
- MEMILI, E. & FIRST, N. L. **Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species.** *Zygote* 8. 2000. P. 87-96.
- MOROZUMI, K. & YANAGIMACHI, R. **Incorporation of the acrosom into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development.** *PNAS* 102. 2005. P. 14209-14214.
- NAGY, Z. P.; JANSSENWILLEN, C.; JANSSENS, R. et al. **Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa.** *Human Reproduction* 13. 6 ed. Brussels, 1998. P. 1606 - 1612.
- PAGE, R. L. & MALCUIT, C. M. **Micromanipulation Techniques for Cloning.** In: CIBELLI, J.; GURDON, J.; WILMUT, I.; et al. *Principles of Cloning.* 2 ed. Elsevier, 2014.
- PALERMO, G.; JORIS, H.; DEVROEY, P.; et al. **Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte.** *Lancet.* 1992. P. 17-18.

PERREAULT, S. D.; BARBEE, R. R.; ELSTEIN, K. H.; et al. **Interspecies Differences in the Stability of Mammalian Sperm Nuclei Assessed in Vivo by Sperm Microinjection and in Vitro by Flow Cytometry.** *Biology of Reproduction* 39. North Carolina, 1988. P. 157-167.

PINCUS, G. & ENZMANN, E. V. **The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs.** *J. Exp. Med.* 62. 5 ed. 1935. P. 665-675.

PRATHER, R. S.; BARNES, F. L.; SIMS, M. M.; et al. **Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte.** *Biology of Reproduction* 37. Madison, 1987. P. 859-866.

REICHENBACH, H. D.; MORAES, J. C. F. & NEVES, J. P. **Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em bovinos.** In: GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R. & FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* 2 ed. São Paulo: Roca, 2008.

ROSS, P. J. & FELTRIN, C. **Cloning Animals by Somatic Cell Nuclear Transplantation.** *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* 2. Davis: Elsevier, 2014.

RUDENKO, L.; MATHESON, J. C. & SUNDLOF, S. E. **Animal cloning and the FDA - The risk assessment paradigm under public scrutiny.** *Nature Biotechnology* 25. 1 ed. Rockville, 2007.

RYBOUCHKIN, A.; KATO, Y. & TSUNODA, Y. **Role of Histone Acetylation in Reprogramming of Somatic Nuclei Following Nuclear Transfer.** *Biology of Reproduction.* Nara, 2006. P. 1083-1089.

SARAIVA, N. Z.; OLIVEIRA, C. S. & GARCIA, J. M. **Histone acetylation and its role in embryonic stem cell differentiation.** *World J Stem Cells* 2 (6). Jaboticabal, 2010. P. 121-126.

SCHNORR, B. **Embryologie der Haustiere.** 2 ed. Stuttgart: Ferdinand Enke, 1989. P. 244.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; et al. **Contribution of the oocyte to embryo quality.** *Theriogenology* 65, 2006. P. 126-136.

STEPTOE, P. C. & EDWARDS, R. G. **Birth after reimplantation of human embryo.** *Lancet*, 1978. Vol. 2. P. 366.

SU, G.H.; SOHN, T.A.; RYU, B.; KERN, S. E. **A novel histone deacetylase inhibitor identified by high-throughput transcriptional screening of a compound library.** *Cancer Research* 60. 2000. P. 3137-3142.

TROUNSON, A.; GUNNL, L.; LACHAM-KAPLAN, O.; et al. **Manipulation of development: opportunities for animal breeding.** *Gametes: develop. and func.* 1998. P. 485-498.

TROUNSON, A.; ANDERESZ, C. & JONES, G. **Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence.** *Reproduction* 121. 2001. P. 51-75.

- TSUJI Y., KATO Y. e TSUNODA Y. **The development potential of mouse somatic cell nuclear-transferred oocytes treated with trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine.** *Zygote* 17. 2009. P. 109-115.
- VERLINSKY, Y. & KULIEV, A. **Micromanipulation of gametes and embryos in preimplantation genetic diagnosis and assisted fertilization.** *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 4 ed. Chicago, 1992. P. 720-725.
- VISINTIN, J. A.; MELLO, M. R. B.; MILAZZOTTO, M. P.; et al. **Bioteχνologias da reprodução animal - Clonagem e transgenia animal.** *Ciênc. vet. tróp. Recife - PE*, 2008. P. 139-144.
- XIONG, X.; WANG, L.; WANG, Y. et al. **Different preferences of IVF and SCNT bovine embryos for culture media.** *Zygote* 22, 2012.
- WAKAI, T.; ITO, J. & FISSORE, R. A. **Artificial Activation of Mammalian Oocytes for Cloning: Present Status and Future Perspectives.** In: CIBELLI, J.; LANZA, R. P.; CAMPBELL, K. H. S.; et al. *Principles of Cloning*. Tokyo, 2014.
- WANG, L.; ZHANG, H.; WANG, Y.; et al. **Scriptaid improves in vitro development and nuclear reprogramming of somatic cell nuclear transfer bovine embryos.** *Cellular Reprogramming* 13 (5). 2011.
- WANG, Y. S.; TANG, S.; NA, Z. X. et al. **Effect of mSOF and G1.1/G2.2 Media on the Developmental Competence of SCNT-Derived Bovine Embryos.** *Reprod. Dom. Anim* 46. 2011a.
- WEI, H. & FUKUI, Y. **Effects of bull, sperm type and sperm pretreatment on male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection in cattle.** *Reprod. Fertil. Dev.* 11 ed. 1999. P. 59-65.
- WESTHUSIN, M. E.; ANDERSON, J. G.; HARMS, P. G.; et al. **Microinjection of spermatozoa into bovine eggs.** *Theriogenology* 21. 1ed. Texas, 1984.
- WILLADSEN, S. M. **Nuclear transplantation in sheep embryos.** *Nature Publishing Group* 320. 1986. P. 63-65.
- WILMUT, I.; BEAUJEAN, N.; SOUSA, P.A.; et al. **Somatic cell nuclear transfer.** *Nature* 419. Roslin, 2002.
- WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; McWHIR, J.; et al. **Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.** *Nature* 385. Edimburgo, 1997.
- WOLF, D. P.; MITALIPOV, S. & NORNGREN, R. B. J. **Nuclear Transfer Technology in Mammalian Cloning.** *Archives of Medical Research*. 32 ed. Elsevier, 2001. P. 609-613.
- WOLF, D. P.; MITALIPOV, S. & NORNGREN, R. B. **Nuclear Transfer Technology in Mammalian Cloning.** 32ed. Beaverton: Elsevier Science Inc, 2001
- YANAGIMACHI, R. **Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and applications in humans and animals.** *Reproductive BioMedicine Online* 10. 2 ed. 2005. P. 247-288.

YANG, X.; CHEN, G.; CHEN, Y. Q.; et al. **Improved developmental potential of rabbit oocytes fertilized by sperm microinjection into the perivitelline space enlarged by hypertonic media.** The Journal of experimental zoology 255. New York, 1990. P. 114-119.

YOSHIDA, M.; KIJIMA, M.; AKITA, M.; et al. **Potent and Specific Inhibition of Mammalian Histone Deacetylase Both in vivo and in vitro by Trichostatin A.** The Journal of Biological Chemistry 265. 28ed. Tokyo, 1990. P. 17174-17179.

ZAMBRANO, F.; AGUILA, L.; ARIAS, M. E.; et al. **Improved preimplantation development of bovine ICSI embryos generated with spermatozoa pretreated with membrane-destabilizing agents lysolecithin and Triton X-100.** Theriogenology, 2016.