



Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) em bovinos *Intrafollicular transfer of bovine immature oocytes (TIFOI)*

José Felipe Warmling Sprícigo^{1,2}, Margot Alves Nunes Dode^{1,3}

¹Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

²Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto Federal Catarinense, IFC, Concórdia, SC, Brasil.

³Correspondência: margot.dode@embrapa.br

Resumo

A transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) surge como biotecnologia inovadora para a produção de embriões bovinos. A técnica baseia-se na injeção de ovócitos, ainda imaturos, em um folículo pré-ovulatório, para que sejam maturados e ovulados *in vivo*. Dessa forma, um “pool” de ovócitos maturados podem ser liberados durante a ovulação, serem fecundados após a inseminação e se desenvolver até o estágio de blastocisto, em um sistema totalmente *in vivo*. A inovação da técnica deriva justamente de sua simplicidade, uma vez que animais submetidos a protocolos simples de sincronização de estro podem ser usados como “ovuladores”. Ainda, animais excedentes da sincronização que não forem utilizadas como ovuladoras, podem ser usados como receptores, no momento da transferência do embrião. Essa revisão visa apresentar os principais fatores envolvidos no desenvolvimento e execução da TIFOI, assim como sumarizar os seus principais resultados e aplicações.

Palavras-chave: folículo, embrião *in vitro*, embrião *in vivo*, cultivo embrionário.

Abstract

The intrafollicular transfer of immature oocytes (TIFOI) emerges as an innovative biotechnology for embryo production in bovine. The technique is based on the injection of immature oocytes into a pre-ovulatory follicle, so that maturation takes place in a follicular environment. Thus, a pool of matured oocyte can be release during ovulation, be fertilized after insemination and develop until blastocyst stage in a totally in vivo system. The novelty of the technique comes from its simplicity, since animals are submitted to a routine estrus synchronization protocols to be used as "ovulators". Furthermore, surplus synchronized animals can be used as receptors, at the time of embryo transfer. This review aims to present the main factors involved on TIFOI development and protocol, besides to summarize the main results and applications of the technique.

Keywords: follicle, *in vitro* embryo, *in vivo* embryo, embryo culture.

Introdução

No Brasil foram produzidos em 2015 um total aproximado de 375.000 embriões bovinos (Viana, 2016). Destes, cerca de 353.000 embriões foram produzidos *in vitro* e 22.000 produzidos *in vivo*. Esses dados mostram a demanda pela multiplicação mais rápida e eficiente não só para obtenção de animais com uma genética diferenciada, mas também para obter ganhos com a heterose mantendo um rebanho com um cruzamento específico (Sartori et al., 2016).

Atualmente, a produção de embriões *in vivo* por superestimulação ovariana (SOV) e a produção de embriões *in vitro* (PIVE) são as opções disponíveis para a multiplicação rápida de germoplasma feminino (Salilew-Wondim et al., 2015). Apesar da SOV produzir um embrião de excelente qualidade, um intervalo de aproximadamente 40 dias entre protocolos de superovulação deve ser respeitado, pois a utilização do hormônio folículo estimulante (FSH) altera os padrões da dinâmica folicular, afetando os resultados das superestimulações subsequentes. Já na PIVE, a doadora pode ser submetida à aspiração folicular orientada por ultrassonografia (OPU) para obtenção de ovócitos semanalmente. Porém, a PIVE demanda uma complexa infraestrutura, envolvendo instalações, equipamentos, meios e pessoal especializado, o que encarece o processo, além de produzir embriões de qualidade inferior aos produzidos *in vivo*. Desta maneira, a utilização de uma técnica que associe as vantagens da produção *in vivo* com as vantagens da PIVE seria a opção ideal para a multiplicação animal.

Neste contexto, a técnica de transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI), recentemente relatada (Sprícigo et al., 2016), surge como uma terceira opção para produção de embriões bovinos. Esta biotecnologia propõe que ovócitos imaturos, obtidos por OPU, possam ser injetados em um folículo dominante que esteja próximo da ovulação em uma vaca receptora dos ovócitos (ovuladora), que será submetida à uma inseminação artificial (IA) convencional. A vaca ovuladora atua então como uma receptora intermediária, suportando o desenvolvimento embrionário inicial até o momento da recuperação dos embriões, já no estágio de blastocisto. Os embriões são então coletados no dia 7 de desenvolvimento e podem ser transferidos para receptoras definitivas, que levarão a gestação à termo, ou podem ser congelados e armazenados em nitrogênio



líquido (NL₂). Desta forma, a TIFOI permite a produção de embriões totalmente *in vivo* a partir de ovócitos aspirados de doadoras selecionadas. A técnica apresenta ainda potencial para uma rápida multiplicação de fêmeas bovinas em um sistema mais simples, acessível e com a possibilidade de redução dos custos quando comparado aos modelos de produção de embriões utilizados atualmente.

Essa revisão tem por objetivo apresentar o histórico, definir o conceito e embasamento fisiológico, relatar os procedimentos, vantagens e desvantagens da TIFOI, além de apresentar os resultados já obtidos e as perspectivas para aplicação dessa técnica.

Histórico (ou desenvolvimento) da tecnologia TIFOI

O primeiro relato em bovinos de transferência intrafolicular de ovócitos para um folículo pré-ovulatório de uma receptora intermediária foi realizado por Fleming e Kuehl em 1985 (Fleming A.D. 1985). Nesse estudo as doadoras de ovócitos foram superestimuladas por 4 dias com FSH e, então foram castradas para obtenção dos ovários e, posteriormente aspiração dos folículos. Os ovários das ovuladoras contendo folículos dominante foram expostos cirurgicamente por uma incisão no flanco. Já Hinrichs e DiGiorgio foram os primeiros a adaptarem essa técnica à equinos (Hinrichs et al., 1991), utilizando um trocater e uma cânula através da parede abdominal na área do flanco para a introdução de uma agulha através da cânula e assim, perfurar a parede externa do folículo. Após esses relatos, a técnica foi aperfeiçoada e passou a ser realizada com o auxílio de um ultrassom transvaginal em equinos (Goudet et al., 1997), bovinos (Bergfelt et al., 1998) e humanos (Werner-Von Der Burg et al., 1993). A produção de embriões bovinos após injeção de ovócitos seguidas por inseminação artificial foi primeiramente relatada por Bergfelt *et al.*, (1998). Porém, neste trabalho os embriões foram recuperados ainda nas fases iniciais (8-16 células), após abate e lavagem do útero e ovidutos dos animais usados no experimento.

Desta forma, apesar da técnica ter sido desenvolvida na década de 90, as primeiras gestações, que resultaram em nascimento em bovinos só ocorreram em 2015 (Kassens et al., 2015a). Porém, esses autores utilizaram ovócitos obtidos de ovários de abatedouro, os quais antes da injeção foram submetidos a maturação *in vitro*, em laboratório. Finalmente, em 2016 foi reportado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Spriçigo et al., 2016) o uso da técnica de transferência intrafolicular, com a utilização de ovócitos imaturos, obtidos por OPU, resultando nos primeiros embriões, gestações e nascimentos, num sistema completamente *in vivo*. Apesar de ser uma técnica recente os resultados mostram o potencial para a produção de embriões, gestações e nascimento de bezerros saudáveis.

Bases fisiológicas da TIFOI

O pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH), cujos receptores encontram-se principalmente nas células da teca, induz a retomada da meiose e a maturação do ovócito mediante mudanças nos níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) e ativação do fator promotor da meiose (MPF) (Van Den Hurk et al., 2005). Está estabelecido que os altos níveis de AMPC no ovócito são necessários para que o bloqueio meiótico seja mantido, mas por outro lado o AMPC em níveis elevados no folículo no momento da ovulação também pode induzir a retomada da meiose. O pico intrafolicular de AMPC que ocorre em resposta ao pico pré-ovulatório de LH desempenha um papel importante na função ovocitária, e tem sido recentemente associado à capacidade do ovócito de suportar o desenvolvimento embrionário (revisado por Gilchrist et al., (2016). O LH inicialmente induz um pico transitório de AMPC intrafolicular que ocorre antes do rompimento da vesícula germinativa. Esse pico leva a diminuição na concentração de guanosina monofosfatada cíclica (GMPc), que por sua vez diminui o efeito inibitório da fosfatidilesterase 3A (PDE3A), a qual é específica do ovócito. A liberação da ação da PDE3A induz a diminuição da concentração de AMPC (Norris et al., 2009; Vaccari et al., 2009), o que é essencial para defosforilação da proteína quinase A (PKA) e ativação do MPF, responsável pela retomada da meiose.

Em outro contexto, ovócitos inclusos em folículos antrais, não responsivos ao LH (2-8mm) se mantêm no estágio de diplóteno da prófase I (imaturos) no ambiente folicular. Esses complexos *cumulus* ovócitos (CCOs) quando retirados do ambiente folicular durante a OPU, perdem a ação do GMPc folicular, levando a uma rápida ativação da PDE3A do ovócito e ao decréscimo dos níveis intracitoplasmáticos de AMPC, com isso ocorre ativação da PKA, perda das junções gap, parada na transcrição, e retomada espontânea da meiose (Tripathi et al., 2010). Após a remoção do ambiente folicular, os ovócitos nesta situação teriam dois destinos, a apoptose ou a progressão da meiose até o estágio de metáfase II, quando maturados *in vitro*.

Portanto, esse período da coleta dos ovócitos é extremamente importante para o sucesso da maturação. Durante esse tempo os CCOs devem receber nutrientes e fatores que inibam a ativação da PDE para que os níveis do AMPC não diminuam rapidamente levando a inativação da PKA. Desta forma, para a TIFOI todo o processo de coleta, seleção e transferência intrafolicular deve ser realizada em líquido folicular, pois esse, segundo Gilchrist et al., (2016), fornece aos CCOs nutrientes necessários para inibir a PDE evitando a retomada espontânea da meiose.

A hipótese da TIFOI é que ovócitos imaturos após a injeção intrafolicular, possam suportar o



desenvolvimento final e maturação, com a mesma eficiência dos padrões fisiológicos, observados em uma ovulação simples. Isso porque os CCOs serão expostos a toda a cascata de eventos induzidos pelo LH retomando e completando a meiose de maneira semelhante à fisiológica. Considerando que o intervalo após o pico de estradiol, até o momento da ovulação, onde teoricamente o ovócito atingiu o estágio de metáfase II, leva entre 28-32 horas pode-se supor que ovócitos imaturos teriam tempo suficiente para sofrerem os eventos biológicos necessários à maturação antes da ovulação.

Após a ovulação ocorre a captação dos ovócitos maturados e seu transporte até o local da fecundação. Sabe-se que a captação é um evento dinâmico, e que poderia ser um obstáculo para a TIFOI, pois ocorre a ovulação de vários e não um único ovócito. Entretanto, a múltipla ovulação também ocorre na SOV, onde o uso de FSH induz o desenvolvimento de diversos folículos, os quais são induzidos a ovulação. Esta técnica apresenta bons índices de captação, avaliados pela recuperação embrionária em função do número de corpos lúteos em D7. Assim, podemos inferir que o evento da ovulação, como ocorre na TIFOI, de vários ovócitos em um único folículo, não seria um entrave para a captação. Porém, é importante lembrar que manipulação dos CCOs pela OPU e durante a injeção destes ovócitos, reduz o número de células do *cumulus*, fator que poderia prejudicar a movimentação e progressão destes no oviduto.

Finalmente, após a chegada de um ovócito maturado e em boas condições à ampola do oviduto, a sequência do desenvolvimento aconteceria, como em uma condição de múltipla ovulação, a exemplo da SOV.

Descrição da técnica TIFOI

A TIFOI consiste na obtenção de ovócitos imaturos de vacas doadoras, através da OPU, seguida pela transferência dos mesmos para o folículo pré-ovulatório de uma vaca previamente sincronizada, no dia do estro. Condições como um diâmetro folicular superior a 10 mm e o momento da injeção, devem ser levados em consideração para garantir aos ovócitos um tempo adequado de maturação neste ambiente folicular. Após a injeção, deve-se realizar a IA. A última etapa da técnica compreende a lavagem uterina, 8 dias após a injeção/inseminação, finalizando com a recuperação dos embriões. As etapas para a realização da TIFOI são descritas a seguir.

Sincronização do estro da ovuladora

A sincronização do estro tem como objetivo induzir o animal ao estro no período desejado, de forma que o mesmo apresente um único folículo dominante (pré-ovulatório) no momento da injeção dos ovócitos. Diferentes protocolos podem ser utilizados, o descrito nesse documento é o protocolo utilizado pelo LRA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A sincronização é iniciada no dia -10 (D-10 em relação ao dia marcado para realizar a TIFOI), com a inserção vaginal do implante de progesterona (1g), associado a aplicação (i.m.) de 2mg de Benzoato de Estradiol. No dia -2, é aplicado (i.m.) um análogo de Prostaglandina $F_{2\alpha}$ (0,150 mg de d-Cloprostenol) juntamente com a remoção do implante, e no dia -1, é feita a administração de 1 mg de Benzoato de Estradiol (i.m.). O dia 0 (D0) será o dia da injeção dos ovócitos e inseminação artificial. Independente do protocolo, o mesmo deve garantir a formação de um único folículo dominante maior que 10 mm de diâmetro. É importante ressaltar que quando esse protocolo é utilizado, ou seja, a TIFOI é realizada entre 52-54 horas após a retirada do implante, a ovulação ocorrerá em aproximadamente 15 a 18 horas (aproximadamente 65 horas após a retirada do implante). A utilização de protocolos diferentes pode ser aplicada, porém requer novas avaliações, com o acompanhamento do momento da ovulação.

Aspiração folicular ou ovum pick up (OPU)

Os ovócitos imaturos são obtidos pela técnica de aspiração folicular (Morotti et al., 2014; Pontes et al., 2011). Os ovócitos são aspirados em PBS (*Phosphate buffered saline*) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino e 1µl/mL de heparina sódica, à temperatura de 36°C. A pressão de aspiração utilizada deve garantir um fluxo do líquido de aspiração entre 13 a 15 mL/min. Para a aspiração, é utilizado um aparelho de ultrassom, equipado com uma probe intravaginal micro convexa de 7,5 MHz montada em um suporte-guia para agulha de aspiração (calibres 18 a 20G), uma bomba de vácuo, e um circuito de aspiração. Os CCOs encontrados são submetidos ao processo de seleção em estereomicroscópio.

Injeção dos ovócitos imaturos

A injeção dos ovócitos deve acontecer entre 48 a 56 horas após a retirada do implante de progesterona. Para a injeção dos CCOs imaturos, os animais devem ser contidos em tronco apropriado, e após a antisepsia local deve-se realizar anestesia epidural baixa com lidocaína a 2%. Para a injeção é necessária uma guia transvaginal semelhante à utilizada no procedimento de OPU. Na guia transvaginal deve estar acoplado um mandril, montado com um sistema fechado, contendo em uma das extremidades uma seringa de insulina e na



outra extremidade uma agulha calibre 27 G. Os ovócitos imaturos devem ser alocados por pressão negativa, dentro da agulha junto com líquido folicular, num volume final de 60 μ L. Todo o sistema deverá ser previamente preenchido com PBS, lembrando a importância da manutenção de uma coluna de ar de aproximadamente 1 cm entre o líquido folicular e o PBS do sistema. A guia será então posicionada no fórnix vaginal e direcionada para o mesmo lado do ovário contendo o folículo dominante. A agulha perfurará o fórnix e a parede do folículo e, logo após, será injetado todo o volume do meio contendo os CCOs. Para assegurar a ovulação num prazo de 24 horas, o ideal é que seja realizada a administração de um análogo do GnRH. É importante ressaltar que a quantidade de ovócitos passíveis de serem injetados em cada folículo ovulatório ainda não está bem definida (experimentos em andamento), logo, recomenda-se que sejam injetados os ovócitos obtidos em cada seção de OPU. Em nosso laboratório, diferentes quantidades já foram utilizadas. No experimento em que foram obtidos os nascimentos dos bezerras Gir, por exemplo, foram injetados aproximadamente 25 ovócitos (Spricigo et al., 2016). Atualmente, está sendo avaliada a injeção de diferentes quantidades (10, 25 e 50 ovócitos). Para ovócitos maturados *in vitro*, Kassens et al. (2015b) utilizaram a injeção de 60 estruturas.

Inseminação artificial (IA)

A inseminação artificial pode ser realizada logo após a injeção dos ovócitos. Porém, experimentos em andamento ainda buscam definir o melhor horário para a realização da mesma. De maneira resumida, após o descongelamento de uma palheta de sêmen, deve-se montar o aplicador, realizar a transposição da cérvix pelo mesmo, e aplicar o sêmen no corpo uterino. Todavia, o ideal é que o aplicador seja direcionado ao corno uterino ipsilateral ao ovário com o folículo dominante. A IA pode, teoricamente, ser realizada com sêmen sexado, porém, ainda não se têm dados referentes ao uso desse tipo de sêmen (experimentos em andamento).

Coleta dos embriões

Após a fecundação, o tempo de desenvolvimento para que o embrião atinja o estágio de blastocisto é de aproximadamente 7 dias. Como o objetivo de recuperar o embrião neste estágio, a lavagem uterina deve ser realizada 8 dias após a injeção dos ovócitos. Antes do início do procedimento de coleta, é importante a avaliação ultrassonográfica do corpo lúteo (CL) e confirmação de que a ovulação ocorreu no ovário onde havia o folículo dominante no momento da injeção. Para a lavagem uterina e coleta dos embriões, os animais devem ser contidos e, após a antissepsia, deve-se realizar anestesia epidural baixa com lidocaína 2%. A coleta é realizada por via transcervical (Rumpf et al., 2000). Após a busca em um estereomicroscópio, os embriões recuperados devem ser avaliados quanto a qualidade morfológica e classificados quanto ao estágio de desenvolvimento de acordo com o manual da IETS (Stringfellow et al., 2007). Para a correta interpretação dos resultados, recomenda-se que um embrião seja descontado do total recuperado. Esta prática evita a contagem de um possível embrião resultante da ovulação do ovócito da própria ovuladora.

Transferência ou congelamento dos embriões

Após a classificação, os embriões poderão ser transferidos para receptoras previamente sincronizadas em D6, D7 ou D8 (dias após o estro). Uma característica importante da TIFOI é que animais remanescentes da sincronização prévia e que não foram utilizados como ovuladores, podem ser utilizados como receptoras. Diferentes protocolos podem ser utilizados para a sincronização, o LRA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia utiliza o mesmo protocolo já descrito para ovuladoras. No dia da transferência, os animais contidos devem ser avaliados quanto a presença e qualidade do CL. Na sequência, realiza-se a antissepsia e a anestesia epidural baixa, com lidocaína 2%. Os embriões são então alocados em palhetas de 0,25 mL em meio de manutenção (*holding*), montadas no inovulador e transferidas para o terço final do corno uterino ipsilateral ao CL. Outra opção é a realização do congelamento destes embriões. Atualmente a vitrificação (Morato et al., 2010) e o congelamento clássico seriam as opções para a criopreservação (Saragusty et al., 2011). Porém, entre os principais objetivos da TIFOI estão, além da produção de um embrião de boa qualidade, a simplificação dos processos de disseminação de material genético. Tomando isto por premissa, assume-se que o congelamento clássico seria hoje a melhor opção para a criopreservação, principalmente pelo fato de permitir a transferência direta do embrião após descongelamento (Van Wagtenonk-De Leeuw et al., 1997).

Vantagens da TIFOI

As técnicas para produção de embriões foram desenvolvidas já há algumas décadas e continuam sendo estudadas e aprimoradas. A primeira delas a SOV, produz o embrião *in vivo*, de excelente qualidade e que suporta bem a criopreservação. A segunda, a PIVE possibilita a produção de maior número de produtos em menor tempo e ainda, maximiza a utilização de sêmen sexado. A TIFOI, por outro lado, é capaz de produzir um embrião totalmente *in vivo*, dispensado a utilização de FSH, o que torna a produção mais barata e menos onerosa



fisiologicamente para a doadora. Ainda comparada a SOV, onde a doadora deve ser submetida a 3 ou 4 ciclos de superestimulação com o FSH, na TIFOI a doadora pode ser aspirada semanalmente. Em relação à PIVE, a TIFOI é uma tecnologia mais acessível, uma vez que todos os componentes de laboratório, incluindo construções, meios e equipamentos de cultivo e transporte, de ovócitos e embriões serão dispensados. Em termos financeiros o embrião produzido por esta técnica poderá ser de 2 à 3 vezes mais barato do que embriões produzidos *in vivo* por SOV ou *in vitro*. Esta biotecnologia também permite a produção do embrião na própria fazenda e mais crioresistente do que o da PIVE, possibilitando o melhor aproveitamento e facilitando a comercialização do material genético.

O desenvolvimento desta biotecnologia, resultará sim, em uma terceira opção para a produção de embriões bovinos. Não substituirá os sistemas atuais, porém, servirá como alternativa simples e de baixo custo para a multiplicação de fêmeas bovinas.

Resultados da TIFOI

A TIFOI é uma técnica ainda em desenvolvimento, e foi lançada no país em novembro de 2016, pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF). A exemplo de outras biotecnologias, os resultados obtidos nesta fase inicial são muitas vezes não satisfatórios para o uso comercial. Entretanto, a expectativa é de que, com o aprimoramento da técnica e consequente aumento nos índices, esta torne-se mais eficiente, viabilizando seu uso comercial. Essa expectativa é baseada no que ocorre quando do desenvolvimento de uma tecnologia, como exemplo pode-se citar o que ocorreu com a PIVE, na qual o primeiro animal produzido no Brasil nasceu em 1994 (Peixer et al., 1994) mas o primeiro laboratório comercial só foi estabelecido no final da década de 1990 (Viana et al., 2012).

A eficiência da técnica pode ser mensurada pela razão entre o número de embriões viáveis recuperados e o número de ovócitos injetados. Como já mencionado anteriormente, é importante ressaltar que para efeito de cálculo, deve-se retirar um embrião do total recuperado, pois assume-se que o mesmo possa ser oriundo do ovócito da própria ovuladora. Como exemplo, tem-se uma vaca ovuladora da qual se recupera 5 embriões, após a exclusão de 1 (potencialmente da própria ovuladora), tem-se 4 extras embriões. Se nesse animal foi realizada a injeção de 20 ovócitos, pode-se concluir que a eficiência seria de 20% (4/20). Tomando a recuperação de embriões como parâmetro, pode-se afirmar que atualmente a TIFOI tem cerca de 10-12% de eficiência. Entre os prováveis fatores responsáveis por esses resultados, pode-se citar a baixa recuperação de estruturas após a lavagem uterina (40%). Cerca de 70-80% das estruturas recuperadas são classificadas como fecundadas (ou seja, a taxa de estruturas não fecundadas é de apenas 20-30%). Assim, pode-se inferir que aumentando a taxa de recuperação de estruturas, a eficiência da técnica também aumentará.

A proposta da TIFOI surgiu pela necessidade de se ter um sistema *in vivo* para a maturação e desenvolvimento de ovócitos após a criopreservação. Inicialmente foi testado a criopreservação de ovócitos após serem maturados *in vivo* (Spricigo et al., 2015), apesar desse sistema ter aumentado a produção de embriões *in vitro* não foi capaz de aumentar a resistência dos ovócitos à criopreservação. Já na TIFOI, o objetivo foi desenvolver um sistema totalmente *in vivo* capaz de maturar, fecundar e suportar o desenvolvimento embrionário, a partir de ovócitos frescos ou vitrificados. Neste foram realizadas 11 injeções com ovócitos frescos, com uma média aproximada de 22 ovócitos por injeção, enquanto que para ovócitos vitrificados 9 injeções foram realizadas, com a mesma média de ovócitos (Spricigo et al., 2016). Nenhum embrião foi obtido quando ovócitos vitrificados foram utilizados para a TIFOI. Porém, com esse estudo mostramos, pela primeira vez, que seria possível produzir blastocistos viáveis e de boa qualidade, usando a TIFOI com ovócitos frescos (Spricigo et al., 2016).

Ainda, buscou-se produzir embriões TIFOI a partir de ovócitos imaturos obtidos por OPU, de vacas Gir (Spricigo et al., 2016). Neste, pretendia-se avaliar a qualidade dos embriões produzidos, observado se seria possível a obtenção de gestações e de bezerros saudáveis após a TE. Foram realizadas 6 sessões de OPU para a obtenção dos ovócitos imaturos. Após seleção, os ovócitos (grupos de 20-25) foram usados para TIFOI em vacas ovuladoras da raça Nelore. Após 8 dias da injeção e inseminação com sêmen de touro da raça Gir, as vacas ovuladoras (n=6) foram submetidas a lavagem uterina na qual foram recuperados 11 embriões. Em dois destes animais foram recuperados mais de um embrião, dois de uma e seis da outra ovuladora. Todos os 11 embriões foram transferidos individualmente para receptoras sincronizadas. Após o diagnóstico, foram detectadas 4 gestações (36%).

Todas as gestações vieram a termo com o nascimento de 4 bezerros. Entre os bezerros nascidos, um foi originado do ovócito da ovuladora, conforme identificado pelo fenótipo típico de animal meio-sangue e também por teste de paternidade, através de exames de DNA (Geneal Diagnósticos LDTA, Uberaba-MG). Os demais foram produzidos a partir dos ovócitos de doadoras Gir utilizados na TIFOI.

A Tabela 1 mostra uma compilação de alguns dos resultados obtidos pelo Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa, realizados até o presente.



Tabela 1-Compilação dos resultados obtidos em diferentes experimentos com a técnica de transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI).

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Geral (soma 3 experimentos)
Número de vacas	22	16	30	68
Procedência ovócitos	Frigorifico	Frigorifico	OPU (Gir e HOL)	-
Média de ovócitos injetados	28	25	16	23
Média diâmetro folicular (mm)	11.2	12.6	12.6	12.1
Média irrigação folicular (escala de 1-5)	1.7	1.5	2.1	1.8
Porcentagem (%) de vacas que não ovularam	27%	18%	0%	15.0%
Média diâmetro CL (mm)	14.5	19.5	18.4	17.5
Média irrigação CL (escala de 1-5)	3.7	4.4	4.4	4.2
Frequência de ovulação OD (%)	66%	53%	56%	58.3%
Total de ovócito injetados	620	400	479	1499
Porcentagem (%) de animais que não foram recuperadas nenhuma estrutura	31%	15%	10%	18.7%
Porcentagem (%) de animais que foram recuperadas 1 ou mais estruturas	56%	92%	76%	74.8%
Total de estruturas recuperadas	175	126	180	481
Porcentagem (%) de estruturas recuperadas	28.20%	31.50%	37.50%	32.4%
Porcentagem (%) de estruturas recuperadas (excluindo as vacas que não ovularam)	36.80%	38.80%	37.50%	37.7%
Número de embriões recuperados	33	40	60	133
Porcentagem (%) de embriões recuperados	5.30%	10.00%	12.50%	9.3%
Porcentagem (%) de embriões recuperadas (excluindo as vacas que não ovularam)	6.90%	12.30%	12.50%	10.6%
Número de estruturas fecundadas (embriões + degenerados)	140	95	143	378
Porcentagem (%) de estruturas fecundadas (embriões + degenerados)/ total injetado	22.60%	23.80%	29.90%	25.4%
Porcentagem (%) de estruturas fecundadas (embriões + degenerados)/recuperadas	80.00%	75.40%	79.40%	78.3%



Considerações Finais

A TIFOI é uma tecnologia com potencial para ser uma opção comercial para a produção de embriões bovinos, assim como já ocorre com biotecnias como a SOV e a PIVE. Ela também pode vir a servir de modelo para a produção de embriões em outras espécies, inclusive em animais silvestres. Entre as vantagens da técnica destacam-se: a não utilização de hormônios para a estimulação de múltiplas ovulações; a produção de embriões totalmente *in vivo* e, portanto, de melhor qualidade; a possibilidade de se usar a doadora semanalmente, dispensa a necessidade de meios complexos, equipamentos e infraestrutura laboratorial. Finalmente, essa biotecnologia volta a valorizar o médico veterinário, além de apresentar potencial para diminuição dos custos de produção de embriões.

Todavia, sabe-se que para comprovar o potencial de uma biotecnologia para uso comercial, além da prova de conceito, é preciso que ela apresente uma logística executável e resultados satisfatórios. Entre estas premissas, a TIFOI atualmente atende as duas primeiras. Como foi mostrado nesta revisão, a técnica é capaz de produzir embriões viáveis e bezerros saudáveis. Também, apresenta uma boa logística, pois todo o processo é realizado na fazenda, os animais sincronizados e não utilizados como ovuladoras podem ser aproveitados como receptoras de embrião no D7. Por fim, em relação ao último quesito, a eficiência ainda precisa ser melhorada. Contudo, assim como ocorreu com outras biotecnias, acredita-se que a progressiva disseminação da TIFOI ajudará a superar os galgos da mesma, melhorando seus resultados.

Referências

- Bergfelt DR, Brogliatti GM, Adams GP.** Gamete recovery and follicular transfer (graft) using transvaginal ultrasonography in cattle. *Theriogenology*, v.50, p.15-25, 1998.
- Fleming AD, Salgado R, Kuehl TJ.** Maturation of baboon or cow oocytes transplanted into a surrogate. *Theriogenology*, v.23, p.192, 1985.
- Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, Vos MD, Sugimura S, Smitz J, Richard FJ, Thompson JG.** Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction*, v.152, p.R143-157, 2016.
- Goudet G, Bezard J, Duchamp G, Palmer E.** Transfer of immature oocytes to a preovulatory follicle: an alternative to in vitro maturation in the mare? *Equine Vet J Suppl*, p.54-59, 1997.
- Hinrichs K, Digiorgio LM.** Embryonic development after intra-follicular transfer of horse oocytes. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, v. 44, p. 369-374, 1991.
- Kassens A, Held E, Salilew-Wondim D, Sieme H, Wrenzycki C, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M.** Intrafollicular Oocyte Transfer (IFOT) of Abattoir-Derived and In Vitro-Matured Oocytes Results in Viable Blastocysts and Birth of Healthy Calves. *Biol Reprod*, v.92, p.150, 2015a.
- Kassens A, Held E, Salilew-Wondim D, Sieme H, Wrenzycki C, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M.** Intrafollicular Oocyte Transfer (IFOT) of Abattoir-Derived and In Vitro-Matured Oocytes Results in Viable Blastocysts and Birth of Healthy Calves. *Biol Reprod*, v.92, p.150, 2015b.
- Morato R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T.** Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. *Reprod Fertil Dev*, v.22, p.1141-1147, 2010.
- Morotti F, Sanches BV, Pontes JH, Basso AC, Siqueira ER, Lisboa LA, Seneda MM.** Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology*, v.81, p. 696-701, 2014.
- Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang H, Ke H, Nikolaev VO, Jaffe LA.** Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, v.136, p.1869-1878, 2009.
- Pontes JH, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KC, Seneda MM.** Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, v.75, p.1640-1646, 2011.
- Peixer MA, Souza RV, Rumpf R, De Bem AR, Neto MAP.** Nascimento dos primeiros produtos de FIV da raça Nelore no Cenargen. *Zootecnia*, v. 32, p. 49, 1994.
- Rumpf R, Bem DE, Peixer MAS, Souza RV.** Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e equina. Brasília: EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.71-103, 2000
- Salilew-Wondim D, Fournier E, Hoelker M, Saeed-Zidane M, Tholen E, Looft C, Neuhoff C, Besenfelder U, Havlicek V, Rings F, Gagne D, Sirard MA, Robert C, Shojaei Saadi HA, Gad A, Schellander K, Tesfaye D.** Genome-Wide DNA Methylation Patterns of Bovine Blastocysts Developed In Vivo from Embryos Completed Different Stages of Development In Vitro. *PLoS One*, v.10, p.e0140467, 2015.
- Saragusty J, Arav A.** Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, v. 141, p. 1-19, 2011.



- Sartori R, Gimenes LU, Monteiro PL, Melo Jr LF, Baruselli PS, Bastos MR.** Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*, v. 86, p. 32-40, 2016.
- Spricigo JF, Diogenes MN, Leme LO, Guimaraes AL, Muterlle CV, Silva BD, Sola-Oriol D, Pivato I, Silva LP, Dode MA.** Effects of Different Maturation Systems on Bovine Oocyte Quality, Plasma Membrane Phospholipid Composition and Resistance to Vitrification and Warming. *PLoS One*, v.10, p.e0130164, 2015.
- Spricigo JF, Sena Netto SB, Muterlle CV, Rodrigues Sde A, Leme LO, Guimaraes AL, Caixeta FM, Franco MM, Pivato I, Dode MA.** Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. *Theriogenology*, v.86, p.2054-2062, 2016.
- Stringfellow DA, Sarah M, Seidel G.** Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS): a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. Savory, Ill: International Embryo Transfer Society. v 17, 2007.
- Tripathi A, Kumar KV, Chaube SK.** Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *J Cell Physiol*, v.223, p.592-600, 2010.
- Vaccari S, Weeks JL 2nd, Hsieh M, Menniti FS, Conti M.** Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod*, v.81, p.595-604, 2009.
- Van Den Hurk R, Zhao J.** Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.
- Van Wagendonk-De Leeuw AM, Den Daas JH, Rall WF.** Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*, v.48, p.1071-1084, 1997.
- Viana JHM, Siqueira LGB, Palhao MP, Camargo LSA.** Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. *Anim Reprod*, v.9, p.12-18, 2012.
- Viana JH.** Produção de embriões bovinos em 2014 e 2015: reflexos de um período de turbulências. *O Embrião*, v.58, n.2, p.6-8, 2016.
- Werner-Von Der Burg W, Coordes I, Hatzmann W.** Pregnancy following intrafollicular gamete transfer. *Hum Reprod*, v.8, p.771-774, 1993.
-