



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES PELA TRANSFERÊNCIA  
INTRAFOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS (TIFOI) EM BOVINOS**

**LUZIA RENATA OLIVEIRA DIAS**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF  
MARÇO DE 2021**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES PELA TRANSFERÊNCIA  
INTRA-FOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS (TIFOI) EM BOVINOS**

**Luzia Renata Oliveira Dias**

**Orientadora: Dra. Margot Alves Nunes Dode**

**Tese de Doutorado em Ciências Animais**

**BRASÍLIA/DF  
MARÇO DE 2021**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DIAS, L. R. O. **Fatores que afetam a produção de embriões pela Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI) em bovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2021, 85 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pela autora à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. A autora e sua orientadora reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem autorização por escrito da autora ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Df           Dias, Luzia Renata Oliveira  
              FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES PELA  
TRANSFERÊNCIA INTRAFOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS (TIFOI) EM  
BOVINOS / Luzia Renata Oliveira Dias; orientador Margot  
Alves Nunes Dode. -- Brasília, 2021.  
              84 p.

              Tese (Doutorado - Doutorado em Administração) --  
Universidade de Brasília, 2021.

              1. blastocisto. 2. desenvolvimento embrionário. 3.  
injeção folicular. 4. produção de embriões bovinos. . I.  
Dode, Margot Alves Nunes, orient. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES PELA TRANSFERÊNCIA  
INTRA-FOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS (TIFOI) EM BOVINOS**

**LUZIA RENATA OLIVEIRA DIAS**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA À  
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM  
CIÊNCIAS ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**MARGOT ALVES NUNES DODE, Doutora (Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia)**

---

**GIANE REGINA PALUDO, Doutora (Universidade de Brasília)**

---

**JOÃO HENRIQUE MOREIRA VIANA, Doutor (Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia)**

---

**JOSÉ FELIPE WARMLING SPRÍCIGO, Doutor (Universidade Federal de Goiás)**

---

**CARLOS FREDERICO MARTINS, Doutor (Suplente - Embrapa Cerrados / CTZL)**

**BRASÍLIA/DF 16 de MARÇO de 2021**

Dedico esse trabalho aos meus pais, Henrique e Dinair, à minha irmã Heloísa, aos meus sobrinhos Geovanna, Maria Clara e Henrique.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que me concede e principalmente por ser minha força maior para superar todas as dificuldades.

Agradeço aos meus pais, Henrique e Dinair, pelo apoio incondicional, amor, carinho, confiança e compreensão. Em especial à minha mãe, por ser meu “esteio”, principal motivo para não desistir nos momentos mais difíceis.

À minha irmã Heloísa, por acreditar na minha capacidade e por me dar mais três motivos para sempre melhorar: Gevonna, Maria Clara e Henrique (sobrinhos).

À Dra. Margot, pela orientação durante o doutorado e pela oportunidade de realizar os experimentos na Embrapa.

Ao Dr. João Henrique Viana, pela análise estatística e pelo “bate-papo” sempre produtivo.

Ao Dr. Ivo Pivato, pelo incentivo de sempre e ajuda nos experimentos.

Ao Dr. José Sprícigo, pelo incentivo para realização dos experimentos e ajuda para delinearlos e executá-los.

Aos pesquisadores, funcionários e colegas do Laboratório de Reprodução Animal e do Campo Experimental Sucupira, EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo suporte e estrutura para realização desse projeto.

À Universidade de Brasília - UnB, pelo curso oferecido.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Animais (PPGCA).

À CAPES, pelo apoio financeiro.

## ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>xvii</b>
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo Geral	3
1.1.2 Objetivo Específicos	3
1.2 HIPÓTESE	3
1.3 PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Produção <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de embriões bovinos	5
2.1.1 Produção <i>in vivo</i>	5
2.1.2 Produção <i>in vitro</i>	7
2.2 Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI)	9
2.3 Fatores que podem afetar a produção de embriões pela TIFOI	14
2.3.1 Desenvolvimento Folicular e Maturação Ovocitária	14
2.3.2 Ovulação	17
2.3.3 Transporte de gametas e embriões	18
2.3.4 Ambiente folicular	19
2.3.5 Preparação da vaca ovuladoras	21
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>33</b>
1 RESUMO	34
2 ABSTRACT	36
3 INTRODUÇÃO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Recuperação de ovócitos e maturação <i>in vitro</i>	39
4.2 Sincronização do ciclo estral e transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI)	40
4.3 Avaliação do diâmetro folicular e da vascularização do fluxo sanguíneo com o Color Doppler	40

4.4 Recuperação de ovócitos do folículo dominante após TIFOI	41
4.5 Avaliação da Maturação Nuclear	41
4.6 Fecundação <i>in vitro</i> e cultivo	42
4.7 Produção <i>in vivo</i> de embriões pela TIFOI	42
4.8 Número total de células e porcentagem de células apoptóticas	43
4.9 Delineamento Experimental	43
Experimento 1: Efeito do sistema de maturação <i>in vivo</i> usando TIFOI na cinética nuclear e produção de embriões	43
4.9.1 Cinética nuclear de ovócitos bovinos submetidos a diferentes tempos de maturação <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i>	43
4.9.2 Desenvolvimento e qualidade de embriões produzidos após maturação ovocitária <i>in vivo</i> e / ou <i>in vitro</i>	44
Experimento 2: Determinação do número de CCOs a serem usados para TIFOI	44
4.10 Análise estatística	45
<b>5 RESULTADOS</b>	46
5.1 Efeito do sistema de maturação <i>in vivo</i> usando TIFOI na cinética nuclear e produção de embriões	46
5.1.1 <i>Efeito do sistema de maturação in vivo usando TIFOI na cinética nuclear</i>	46
5.1.2 <i>Desenvolvimento e qualidade de embriões produzidos após a maturação ovocitária in vivo e / ou in vitro</i>	48
5.2 <i>Determinação do número de CCOs a serem usados para TIFOI</i>	49
<b>6 DISCUSSÃO</b>	52
<b>7 CONCLUSÕES</b>	55
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	56
<b>CAPÍTULO 3</b>	58
1 RESUMO	59
2 ABSTRACT	61
3 INTRODUÇÃO	63
4 MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1 Recuperação de ovócitos e maturação <i>in vitro</i>	65
4.2 Fecundação e cultivo <i>in vitro</i>	66
4.3 Sincronização do estro e transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI)	66
4.4 Coleta de embriões após TIFOI	67
4.5 Coloração diferencial de células	68
4.6 Análise estatística	68



4.7 Delineamento Experimental	69
4.7.1 Efeito do momento da TIFOI após a retirada do implante na recuperação e qualidade embrionária	69
4.7.2 Efeito do momento da indução da ovulação após a TIFOI na taxa de recuperação e qualidade embrionária	70
5. RESULTADOS	72
5.1 Efeito do momento da TIFOI na recuperação e qualidade embrionária	72
5.2 Efeito do momento da indução da ovulação após a TIFOI na taxa de recuperação embrionária	75
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÕES	80
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS	83

## RESUMO

A transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) é uma técnica alternativa para produção de embriões bovinos, na qual ovócitos imaturos, são injetados em um folículo dominante e são maturados, fecundados e tem o desenvolvimento inicial *in vivo*. Apesar de seu potencial de aplicação, a TIFOI ainda apresenta uma baixa taxa de recuperação embrionária no dia 7 (D7) após a injeção. Sendo assim, muitos aspectos do processo ainda precisam ser esclarecidos para que a sua eficiência possa ser melhorada.. O objetivo deste trabalho foi tentar identificar fatores que possam afetar os resultados da técnica. Para isso avaliou-se (1) a cinética de maturação nuclear de ovócitos submetidos à TIFOI; (2) se o tempo em que os ovócitos permanecem no folículo é suficiente para que ocorra a maturação completa; (3) o número de ovócitos mais adequado a serem injetados no folículo pré-ovulatório no momento da TIFOI; (4) se o tempo em que os ovócitos permanecem no folículo após a injeção afeta a taxa de recuperação embrionária; (5) diferentes momentos para realizar a injeção após a remoção do implante de progesterona (P4); e, (6) se o momento da indução da ovulação e a adequação de um protocolo de sincronização das ovuladoras afeta a taxa de recuperação embrionária. Para isso, foram realizados 4 estudos: (1) ovócitos imaturos obtidos de ovários de abatedouro, foram injetados no folículo pré-ovulatório de vacas ovuladoras (TIFOI) e mantidos no folículo por 8, 12 ou 16 h, ou foram maturados *in vitro* (MIV) por 0, 8, 12 ou 16 h. Para a avaliação da capacidade de desenvolvimento embrionário, os ovócitos injetados no folículo préovulatório foram recuperados por OPU 12 h após a TIFOI e submetidos à fecundação *in vitro* (FIV) imediatamente após a OPU ou foram maturados *in vitro* por 4 h adicionais ou 10 h após a OPU. Os ovócitos do grupo controle foram maturados *in vitro* por 12, 16 e 22 h, antes de serem submetidos à FIV. (2) avaliou-se a taxa de recuperação embrionária após a injeção de 10, 25 ou 50 complexos cumulus ovócitos (CCOs) durante a TIFOI; (3) ovócitos imaturos foram injetados, 24, 36 e 52 h após a remoção do implante de progesterona e 8 dias depois realizou-se a coleta de embriões; (4) ovócitos imaturos foram injetados 30 (TIFOI 30h) ou 36 (TIFOI D9,5) h após a remoção do implante de progesterona e a indução da ovulação foi realizada 24 h após a remoção de P4 (TIFOI

D30h), 40 h após a remoção de P4 ou 52 h remoção de P4, e 8 dias depois realizou-se a coleta de embriões. No estudo 1, os ovócitos maturados por TIFOI apresentaram maturação nuclear semelhantes àqueles maturados *in vitro*; e o tempo durante o qual os ovócitos permaneceram dentro do folículo após a TIFOI não afetou a taxa de recuperação e sua capacidade de serem fecundados e se desenvolverem em embriões; No estudo 2, o número de ovócitos injetados no folículo não afetou a taxa de recuperação embrionária; No estudo 3, o tempo em que os ovócitos permanecem no folículo após a TIFOI ser realizada em diferentes momentos afetou a taxa de recuperação embrionária. Finalmente, no estudo 4, o momento em que a indução da ovulação é realizada interfere na taxa de recuperação embrionária. Conclui-se que apesar de esclarecer alguns fatores importantes para o desenvolvimento da TIFOI, a taxa de recuperação embrionária ainda não foi melhorada.

**Palavras-chave:** blastocisto; desenvolvimento embrionário; injeção folicular; produção *in vitro* de embriões.

## ABSTRACT

Intrafollicular transfer of immature oocytes (IFOT) is an alternative technique for the production of bovine embryos, in which immature oocytes, recovered by ovum pick-up (OPU), are injected into a dominant follicle, and they are matured, fertilized and underwent initial development in vivo. Despite its application potential, IFOT still results in a low rate of embryonic recovery on day 7 (D7) after injection. Therefore, many aspects of the process still need clarification so that its efficiency can be improved. The aim of this study was to identify factors that may affect the results of the technique, and contribute to its development. Therefore, we evaluated (1) if the nuclear maturation kinetics of oocytes submitted to IFIOT were evaluated; (2) whether the time in which the oocytes remain in the follicle would be sufficient to mature, be fertilized and develop into embryos; (3) the number of oocytes to be injected into the preovulatory follicle at the time of IFOT; (4) whether the time that the oocytes remain in the follicle after the injection would affect the embryonic recovery rate; (5) different moments to perform the injection after the removal of the progesterone implant; (6) whether the timing of ovulation induction and the adequacy of an ovulation synchronization protocol would affect embryo recovery rate. For this, 4 experiments were carried out: (1) immature oocytes, obtained from slaughterhouse ovaries, were injected into the ovulatory cows pre-ovulatory follicle (IFIOT) and kept in the follicle for 8, 12 or 16 h or were in vitro matured (IVM) for 0, 8, 12 or 16 h. In addition, for the evaluation of embryonic developmental capacity, oocytes were recovered by OPU at 12 h after IFIOT and submitted to in vitro fertilization (IVF) immediately after OPU or were in vitro matured for an additional 4 h or 10 h after OPU. Control oocytes were matured in vitro for 12, 16 or 22 h, before being submitted to IVF; (2) the embryo recovery rate after the injection of 10, 25 or 50 cumulus oophorus (COCs) complexes during IFIOT was evaluated; (3) immature oocytes were injected 24, 36 or 52 h after the removal of the progesterone implant and 8 days later, embryo collection was performed; (4) immature oocytes were injected 30 (IFIOT 30h) and 36 (IFIOT D9.5) h after removal of the progesterone implant and ovulation induction was performed 24 h after removal of P4 (IFIOT D30h), 40 h after P4 removal or 52 h P4 removal, and 8 days

later, embryo collection was performed. In study 1, oocytes matured by IFIOT showed nuclear maturation similar to those matured in vitro; and the time during which the oocytes remained within the follicle after TIFOI did not affect the recovery rate and its ability to be fertilized and to develop in embryos; In study 2, the number of oocytes injected into the follicle did not affect the rate of embryonic recovery; In experiment 3, the time that the oocytes remain in the follicle after IFIOT is performed at different times affected the rate of embryonic recovery. Finally, in experiment 4, the time when ovulation induction is performed interferes with the rate of embryonic recovery. In conclusion, despite some important factors for the development of IFIOT were explained, the embryonic recovery rate was not improved.

Keywords: blastocyst; embryonic develop; follicular injection; in vitro embryo production.

## LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Representação esquemática do desenho experimental do experimento 1. No dia 0 (D) as ovuladoras receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) associado à aplicação de benzoato de estradiol (BE). Oito dias depois, o dispositivo de P4 foi removido e os animais receberam uma injeção de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ). No dia 9, foi administrado BE (im). A injeção de ovócitos no folículo pré-ovulatório (TIFOI) foi realizada 24, 36 e 52 h após a remoção da P4. A inseminação artificial (IA) e a indução da ovulação foram realizadas 52 h após a retirada do implante e a coleta dos embriões no D18. No grupo controle os embriões foram produzidos *in vitro* (PIV). Os embriões em estágio do blastocisto expandido (Bx) foram avaliados por coloração diferencial. 70
- Figura 2.** Esquema ilustrativo do delineamento experimental do experimento 2. No dia 0 as ovuladoras receberam um dispositivo de progesterona (P4) intravaginal associado à aplicação de benzoato de estradiol (BE). Oito dias depois, os animais receberam injeção de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) e o dispositivo de P4 foi retirado. Após 24 h, o BE (im) foi administrado. A injeção de ovócitos no folículo pré-ovulatório (TIFOI) foi realizada 36 h após a retirada da progesterona para os grupos TIFOI 36 e TIFOI 36+ e a inseminação artificial (IA) 52 h após a retirada do implante P4; e 52 (TIFOI 36) e 40 h (TIFOI 36+) após a remoção do P4 receberam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), respectivamente. A coleta dos embriões foi realizada no D18 e os embriões foram avaliados. Bx foram utilizados para coloração diferencial. Para PIV, os embriões foram produzidos conforme protocolo de laboratório e no dia 7 (D7), os Bx foram utilizados para coloração diferencial. 71

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Estágio meiótico de ovócitos imaturos (IMA), maturados *in vitro* por 8, 12 ou 16 h (MIV8, MIV12 ou MIV16) ou maturados *in vivo* após transferência intrafolicular por 8, 12 ou 16 h (TIFOI8, TIFOI12 ou TIFOI16). 47
- Tabela 2.** Desenvolvimento embrionário de ovócitos maturados *in vitro* (MIV) por 12, 16 ou 22 h (MIV12, MIV16 e MIV22), ou maturados *in vivo* após transferência intrafolicular por 12 h (TIFOI12), maturados *in vivo* por 12 h com 4 adicionais (TIFOI16) ou 10 h adicionais de MIV (TIFOI22). 48
- Tabela 3.** Número total de células e porcentagem de células apoptóticas de blastocistos expandidos obtidos de ovócitos maturados *in vitro* (MIV) por 12, 16 ou 22 h (MIV12, MIV16 e MIV22) ou maturados *in vivo* por 12 h (TIFOI12), ou maturados *in vivo* durante 12 h com 4 (TIFOI16) ou 10 (TIFOI22) h adicionais de MIV. 49
- Tabela 4.** Diâmetro e irrigação (média  $\pm$  D.P.) do folículo antes da transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) e do corpo lúteo (CL) 8 dias após a TIFOI. A taxa de ovulação é representada pela porcentagem (%) de vacas usadas para a TIFOI e que ovularam. 50
- Tabela 5.** Número (N) de ovócitos injetados e número (N) e porcentagem (%) de estruturas e embriões recuperados no dia 8 (D8) quando o ovócito nativo foi incluído (Recuperação Total) ou excluído (Recuperação Verdadeira). A taxa de fecundação, representada pelo número (N) e porcentagem (%) de estruturas degeneradas e embriões recuperados, em função do número de ovócitos injetados, em cada tratamento (10, 25 ou 50 ovócitos). 51

### CAPÍTULO 3

- Tabela 6.** Dados de recuperação de embriões, estruturas e estruturas fecundadas, a partir de ovócitos injetados no folículo pré-ovulatório através da transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) realizada às 24 (TIFOI 24), 36 (TIFOI 36) e 52 h (TIFOI 52) após a remoção do implante de progesterona. 73
- Tabela 7.** Parâmetros foliculares e luteais após a injeção intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) realizada após a TIFOI realizada às 24 (TIFOI 24), 36 (TIFOI 36) e 52 h (TIFOI 52) após a remoção do implante de progesterona. 74
- Tabela 8.** Qualidade embrionária de blastocistos expandidos (Bx) resultantes da transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) realizada às 24 (TIFOI 24), 36 (TIFOI 36) e 52 h (TIFOI 52) após a remoção do implante de progesterona (P4) e do grupo Controle. 74

- Tabela 9.** Dados de recuperação de embriões, estruturas e estruturas fecundadas, a partir de ovócitos injetados no folículo pré-ovulatório através da transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) 36 h (TIFOI 36) e 36 h + indução da ovulação 40 h (TIFOI 36+) após a remoção do implante de progesterona. 75
- Tabela 10.** Análise de parâmetros associados a fisiologia folicular e luteal. Diâmetro folicular na transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI), redução do diâmetro folicular 6h pós TIFOI (%), redução diâmetro folicular à ovulação (%), ovulação após a TIFOI (h pós TIFOI), ovulação (h pós remoção P4), diâmetro do corpo lúteo (CL) (mm) no D18, de vacas ovuladoras submetidas à TIFOI 36 h (TIFOI 36) e 36 h + indução da ovulação 40 h (TIFOI 36+) após a remoção do implante de progesterona. 76
- Tabela 11.** Dados da qualidade embrionária de blastocistos expandidos (Bx) resultantes da transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) 36 h (TIFOI 36) e 36 h + indução da ovulação 40h (TIFOI 36+) após a remoção do implante de progesterona; e do grupo Controle. 76



## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

## 1 INTRODUÇÃO

Técnicas de reprodução assistida são usadas rotineiramente em programas de melhoramento para disseminar as características de animais economicamente importantes de maneira rápida e eficiente. Enquanto a inseminação artificial (IA) pode aumentar potencialmente a taxa de ganho genético dos rebanhos, através da utilização de touros com alto mérito genético, a produção de embriões permite o melhor uso do germoplasma feminino. Em relação à produção de embriões, a superestimulação ovariana (SOV) e a produção *in vitro* de embriões (PIV) associada à *ovum pick-up* (OPU) são as técnicas mais utilizadas em programas de melhoramento.

Ambas as técnicas permitem a produção de maior número de bezerros por fêmea por ano, em comparação à monta natural e a IA. No entanto, cada uma dessas técnicas tem vantagens e desvantagens. A superestimulação ovariana proporciona a produção de embriões de melhor qualidade, com maior resistência à criopreservação do que a PIV, mas provoca desequilíbrio hormonal transitório na vaca doadora após a administração do hormônio folículo estimulante (FSH). Por outro lado, na PIV a OPU pode ser feita semanalmente; no entanto, a exigência de um ambiente *in vitro* para a maturação de ovócitos, fecundação e cultivo tem efeitos deletérios sobre a qualidade do embrião e a crioresistência (Sudano et al., 2014).

Os embriões bovinos produzidos *in vitro* diferem dos produzidos *in vivo* em vários aspectos. O sistema *in vitro* promove alterações nas características bioquímicas e morfológicas embrionárias, como conteúdo de gotículas lipídicas (Sudano et al., 2011), perfil de membrana fosfolipídica (Sudano et al., 2011), expressão gênica (Machado et al., 2013), consumo de oxigênio (Gaspar et al., 2015), organização citoesquelética (Kuzmany et al., 2011), taxa de apoptose (Pomar et al., 2005), número de células (Crosier et al., 2001) e densidade de mitocôndrias (Crosier et al., 2001). Juntas, essas alterações podem explicar a qualidade inferior dos embriões *in vitro* em comparação com os embriões produzidos *in vivo*. Apesar dos avanços nos sistemas de cultivo obtidos nos últimos 20 anos (Blondin, 2015), a taxa de prenhez à fresco ainda permanecem ainda em torno de 40% (Wrenzycki, 2016;

Demetrio et al., 2020). Além disso, quando se compara a taxa de prenhez de embriões que foram submetidos à criopreservação observa-se que a taxa alcançada após a transferência de embriões congelados / descongelados *in vivo* (50%) é superior àquela para embriões congelados / descongelados produzidos *in vitro* (0 - 40%) (Sartori et al., 2016; Wrenzycki, 2016; Demetrio et al., 2019; Demetrio et al., 2020; Hansen, 2020; Reese et al., 2020).

Portanto, combinar as vantagens da SOV e OPU-PIV seria ideal para produzir embriões de melhor qualidade. A transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) é uma técnica (Bergfelt et al., 1998; Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017) na qual ovócitos imaturos, recuperados por OPU, são injetados em um folículo dominante e são maturados, fecundados e cultivados *in vivo*. Estudos mostraram que com essa técnica é possível obter embriões de boa qualidade, prenhez segura e o nascimento de bezerros saudáveis (Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017).

Apesar do potencial da TIFOI, esta ainda apresenta uma baixa taxa de recuperação embrionária (~ 10%) no dia 7 (D7) após a injeção (Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017, Andrlíkova et al., 2020). Entretanto, muitos aspectos da técnica ainda precisam ser esclarecidos para que a sua eficiência possa ser melhorada. Dentre os vários fatores que podem afetar a eficiência dessa técnica, pode-se citar o tempo que os complexos cumulus ovócitos (CCOs) são mantidos dentro do folículo após a injeção e antes da ovulação. Isso porque os ovócitos injetados precisam ter tempo suficiente para completar a meiose, mas esse tempo não pode ser demasiado para evitar o envelhecimento desses. Outro fator importante é o número ideal de CCOs que devem ser transferidos para o folículo dominante, pois o número de ovócitos pode comprometer a interação entre os gametas, aumentar o consumo de O<sub>2</sub>, aumentar a competição por hormônios e fatores de crescimento e limitar a expansão do cumulus (Brum et al., 2005). Além disso, o número de ovócitos injetados também pode afetar indiretamente a captação pelas fimbrias, diminuindo as taxas de fecundação ou até mesmo comprometendo o desenvolvimento embrionário. Outro aspecto que precisa ser considerado para a recuperação de embriões, é o momento em que os ovócitos são injetados no folículo dominante em relação à retirada do implante de progesterona. Ainda não se sabe qual o momento ideal para realizar a injeção dos ovócitos no folículo pré-ovulatório, uma vez o pico pré-ovulatório de LH é o estímulo para a retomada da meiose e para a ovulação do folículo dominante num tempo pré-determinado. Além disso, não se sabe se o momento da realização da injeção poderia afetar a taxa de recuperação embrionária, pelo tempo em que os ovócitos permanecerão no folículo após a injeção.

Portanto, este trabalho teve por objetivos identificar alguns fatores que podem afetar a eficiência da técnica de TIFOI, tais como a maturação nuclear dos ovócitos submetidos à TIFOI, tempo de permanência de CCOS dentro do folículo, número de ovócitos injetados, momento ideal para realização da injeção e comparar momentos diferentes para a indução da ovulação.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Avaliar fatores que podem potencialmente influenciar os resultados da técnica de TIFOI.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

a) Avaliar a cinética de maturação nuclear de ovócitos bovinos transferidos para o folículo pré-ovulatório e se o tempo em que eles permanecem no folículo após a TIFOI é o suficiente para maturarem, serem fecundados e se desenvolverem em embriões;

b) Determinar o número ideal de CCOs para serem injetados no folículo pré-ovulatório no momento da TIFOI;

c) Verificar se o tempo em que os ovócitos permanecem no folículo após a injeção afeta a taxa de recuperação embrionária;

d) Comparar diferentes momentos após a remoção do implante de progesterona para realizar a injeção dos ovócitos e o efeito do momento da indução da ovulação na taxa de recuperação embrionária.

## **1.2 HIPÓTESE**

1.2.1 A maturação nuclear e o desenvolvimento embrionário de ovócitos injetados durante a TIFOI são semelhantes aos do sistema *in vitro*.

1.2.2 O número de ovócitos injetados durante a TIFOI e o tempo em que eles permanecem no folículo após a injeção, podem afetar o desenvolvimento embrionário e a qualidade dos embriões.

### **1.3 PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA**

A TIFOI é uma técnica que permite que ovócitos obtidos por aspiração folicular sejam submetidos a maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vivo*, evitando os possíveis efeitos deletérios causados pelo ambiente *in vitro*. Além disso, todas as etapas desta técnica são realizadas na fazenda, facilitando o trabalho do técnico e reduzindo custos fixos. A TIFOI possibilita a valorização do profissional veterinário a campo, uma vez que para sua realização, o profissional envolvido deve realizar as técnicas de aspiração folicular, injeção de ovócitos, lavagem uterina para coleta dos embriões resultantes após a injeção dos ovócitos imaturos e a transferência desses embriões para vacas receptoras. Apesar da TIFOI ser uma técnica atrativa a taxa de recuperação embrionária após o seu uso é considerada baixa (cerca de 10%). Portanto, vários fatores que podem afetar a técnica precisam ser esclarecidos, para que se possa melhorar a sua eficiência.

Assim, estudos que abordem esse e outros tópicos envolvidos nos vários passos da técnica podem contribuir para o seu desenvolvimento e aprimoramento. Além disso, para outras tecnologias que dependem da etapa de maturação ovocitária e necessitam de um melhor ambiente para o desenvolvimento embrionário, como por exemplo, a clonagem, criopreservação, a melhora nos resultados da técnica TIFOI se torna de grande importância.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos

#### 2.1.1 Produção *in vivo*

No processo clássico de geração de embriões *in vivo*, a indução da superovulação em vacas doadoras tem como objetivo aumentar o número de folículos ovulatórios e conseqüentemente o número de embriões produzidos pelo animal. Para isso, os ovários são estimulados pela ação de hormônios que promovem o desenvolvimento e maturação de vários folículos, de forma simultânea, induzindo ovulações múltiplas. No entanto, a resposta ovariana pode ser variável e pode estar relacionada a vários fatores, desde as diferenças nos tratamentos superovulatórios até fatores que são inerentes ao animal e seu ambiente (Bó & Mapletoft, 2014).

As gonadotrofinas mais utilizadas na SOV são a gonadotrofina coriônica equina (eCG) e o hormônio folículo estimulante (FSH), por apresentarem maior eficiência quanto à estimulação ovariana. A eCG possui atividade de FSH e do hormônio luteinizante (LH), tem meia-vida de cerca de 40 h e geralmente é utilizada em dose única (Murphy & Martinuk, 1991). No entanto, por possuir meia-vida longa, esta gonadotrofina pode provocar a estimulação ovariana continuada, podendo levar ao desenvolvimento de cistos foliculares, além de promover a luteinização dos folículos antes da ovulação e alterar a maturação do ovócito no interior do folículo (Greve et al., 1983). Ademais, pode provocar o aumento na concentração circulante de estradiol e afetar a qualidade dos embriões coletados (Baruselli et al., 2006; Martins et al., 2007). Para controlar esses efeitos, anticorpos contra eCG no momento da inseminação já foram utilizados, mas sua produção foi descontinuada (Gonzalez et al., 1994). O FSH possui meia-vida estimada em até 5 h, por isso deve ser injetado duas vezes ao dia, durante 4 dias, e possui melhor eficiência quando comparado à eCG. O FSH extraído da hipófise de suínos (FSH-P) é o mais utilizado nos programas de SOV em bovinos

e seu efeito é superior na produção de embriões, quando comparado à eCG. Porém, o grau de pureza do FSH-P pode variar, afetando a qualidade dos embriões produzidos (Laster, 1972).

Alguns estudos utilizaram o Folltropin-V, que é um dos produtos comerciais do FSH-P altamente purificado demonstraram resultados satisfatórios quanto às taxas de prenhez em bovinos, após a superestimulação ovariana e transferência dos embriões coletados (Bényei & Barros, 1991). Este produto apresenta menor contaminação de LH no extrato de hipófise suíno, podendo resultar na menor recuperação embrionária por doadora, mas no aumento da qualidade dos embriões recuperados (Bó & Mapletoft, 2014).

O FSH bovino produzido de forma recombinante (rbFSH) e sem adição de LH induziu altas respostas superovulatórias (Looney et al., 1988). No entanto, o uso de rbFSH humano em novilhas induziu a uma menor resposta superovulatória quando comparado à utilização da eCG (Takagi et al., 2001). Além disso, a resposta superovulatória do rbFSH foi semelhante ao FSH-P, do qual 84% do LH foi removido (Carvalho et al., 2014).

Apesar da resposta superovulatória obtida com o FSH, um dos fatores que limita seu uso é a quantidade de aplicações necessárias durante os protocolos. São necessárias duas aplicações diárias com intervalo de 12 h, durante 4 dias, o que dificulta o manejo. Focando nesse problema, alguns trabalhos testaram a utilização de polímeros que prolongassem a liberação do FSH-P, utilizando apenas uma administração intramuscular (IM) (Yamamoto et al., 1994; Takedomi et al., 1995; Callejas et al., 2002; Chasombatet et al., 2013; Bó et al., 2018). Entre as substâncias testadas, a polivinilpirrolidona (PVP) apresentou resposta superovulatória semelhante aos protocolos de aplicação de duas doses diárias (Yamamoto et al., 1994; Takedomi et al., 1995; Chasombatet et al., 2013), ou respostas reduzidas (Callejas et al., 2002; Bó et al., 2018). Outro veículo que resultou em resposta superovulatória semelhante foi o ácido hialurônico, quando usado como diluente para o FSH-P (Tribulo et al., 2011; Tribulo et al., 2012). Ademais, a utilização de FSH e eCG associados também mostrou resultados satisfatórios quanto ao número de embriões viáveis por coleta (Barros et al., 2008; Mattos et al., 2011).

Independente de qual gonadotrofina é utilizada durante a SOV, a resposta das doadoras pode ser variável, limitando o número de coletas anuais e aumentando os custos de produção. Desta forma, a técnica passou a ser menos atraente, por possuir um alto grau de imprevisibilidade, resultando em problemas que afetam a eficiência e rentabilidade da transferência comercial de embriões. Apesar da qualidade dos embriões produzidos *in vivo* ser superior aos produzidos *in vitro*, com o surgimento da PIV a SOV passou a ser menos utilizada (Viana et al., 2017).

O impacto na produção de embriões *in vivo* pode ser observado pelos dados de produção de embriões no Brasil. Em 2005, a produção correspondia à 15,5% dos embriões produzidos no mundo. Já em 2015, a produção caiu para 3,4%. Entretanto, a produção de embriões *in vitro* aumentou 16,3% nesse mesmo período, passando de 41,4% em 2005, para 57,7%, 10 anos depois (Viana et al., 2017). Em 2017, os Estados Unidos da América (EUA) produziram mais embriões *in vitro* do que o Brasil (421.123 vs. 345.528, respectivamente), liderando o ranking mundial de produção de embriões (Viana, 2018). Em 2019, a produção de embriões no mundo totalizou 72,7% (1.031.567) vs. 27,3% (387.769) de embriões produzidos *in vivo* (Viana, 2020).

Apesar da redução observada na produção de embriões *in vivo*, os resultados relativos às taxas de prenhez oriundas da transferência de embriões frescos ou congelados resultantes da SOV são incontestáveis, variando entre 46 e 67% de prenhez em novilhas, como já relatado (Demetrio et al., 2020).

### **2.1.2 Produção *in vitro***

Desde o seu surgimento, a PIV passou por avanços consideráveis e atualmente é considerada uma técnica estabelecida. Apesar do embrião produzido ser de qualidade inferior àqueles produzidos *in vivo*, a partir do desenvolvimento da OPU a técnica superou a produção por SOV, tornando-se mais atraente em termos de produção e multiplicação rápida de animais de interesse econômico (Rumpf, 2007). Esse avanço da PIV com relação à SOV pode ser observado de acordo com os dados de produção de embriões no mundo citados acima. Além disso, a participação do Brasil na produção mundial de embriões PIV é altamente relevante. Em 2015, foram produzidos 375.894 embriões, dos quais 353.539 foram produzidos *in vitro* e 22.355 produzidos *in vivo* (Viana, 2017). Em 2017, o país produziu 345.528 embriões, correspondendo à 34,8% do total mundial (Viana, 2018), e em 2019 foram produzidos 299.870 embriões, correspondendo à 29% da produção mundial (Viana, 2020).

Ao contrário da produção *in vivo* de embriões, a PIV necessita de um ambiente de cultivo que mimetize a condição *in vivo*, desde o ambiente folicular até o ambiente uterino, envolvendo, portanto, as etapas de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) (Moore & Hasler, 2017).



Dentre as etapas da PIV a maturação pode ser considerada a condição mais importante, pois a qualidade do ovócito que determina a sua capacidade de ter o desenvolvimento embrionário e resultar numa prenhez (Austin et al., 1999). Cerca de 80 a 90% os ovócitos que são destinados à maturação *in vitro* sofrem maturação nuclear, e após a fecundação 30 a 40% chegam até o estágio de blastocisto. Além disso, após a transferência para vacas receptoras, cerca de 50% destes embriões resultam em gestação (Rizos et al., 2008; Wrenzucki, 2016; Ealy et al., 2019).

Com a PIV é possível a produção de embriões viáveis a partir de fêmeas com mérito genético superior às demais do rebanho. A técnica possibilita a utilização de bezerras a partir dos seis meses de idade, fêmeas prenhes até o terceiro mês de prenhez e fêmeas com infertilidade adquirida ou que não respondem a SOV como doadoras de ovócitos (Hasler et al., 1995). Além disso, as fêmeas podem ser aspiradas a cada 7 ou 15 dias dispensando a utilização de hormônios, e com isso aumenta o número dos produtos obtidos em menor espaço de tempo (Pontes et al., 2011). Outra vantagem de se utilizar a PIV é a possibilidade de otimizar a dose de sêmen de touros geneticamente superiores e com as características desejáveis para serem utilizados durante a FIV. Isso porque com uma dose de sêmen é possível inseminar várias gotas, cada uma podendo conter vários ovócitos de diferentes animais. Esse fato é especialmente importante quando o sêmen sexado é utilizado, considerando o maior custo e a qualidade inferior deste (Baruselli et al., 2007).

Apesar de apresentar muitas vantagens, diversos fatores podem afetar a PIV e, conseqüentemente, afetar a qualidade embrionária, a taxa de prenhez após a transferência, e a taxa de nascimento de bezerros saudáveis. Dentre os fatores, o tempo de transporte dos ovócitos da fazenda até o laboratório, e dos embriões até o retorno à fazenda, pode ser prejudicial à viabilidade dos mesmos. Isso porque ambos precisam de um ambiente controlado, no que se refere a temperatura, pH e atmosfera gasosa (Cavaliere et al., 2015). A composição dos meios de maturação, fecundação e cultivo, juntamente com as demais características de um sistema *in vitro* podem induzir alterações nas características bioquímicas e morfológicas dos embriões, sendo uma desvantagens da PIV quando comparada à produção *in vivo* de embriões. Dentre essas alterações, estudos já demonstraram mudanças no conteúdo de gotículas lipídicas (Sudano et al., 2011), perfil de membrana fosfolipídica (Sudano et al., 2011), expressão gênica (Machado et al., 2013), consumo de oxigênio (Gaspar et al., 2015), organização citoesquelética (Kuzmany et al., 2011), taxa de apoptose (Pomar et al., 2005), número de células (Crosier et al., 2001) e na densidade de

mitocôndrias (Crosier et al., 2001). Juntas, essas alterações podem explicar a qualidade inferior dos embriões *in vitro* em comparação com os embriões produzidos *in vivo*.

Vale ressaltar que após a transferência de embriões PIV, apesar da confirmação da gestação e o nascimento de bezerros saudáveis, a grande maioria dos não estabelece a prenhez, podem apresentar disfunção placentária ou alterações no desenvolvimento fetal (Hansen, 2020). Já foi demonstrado aumento no tamanho da placenta e reduções nas vilosidades fetais de conceptos bovinos de origem *in vitro* (Miles et al., 2004) e distúrbios como a “síndrome do bezerro grande”, fenótipo anormal de fetos derivados de embriões PIV (Young et al., 1998; Farin et al., 2006; Farin et al., 2010; Bonilla et al., 2014) além de maior incidência de malformações e anomalias congênitas (Kruip et al., 1997; Van Wagtendonk-De Leeuw et al., 1998).

Portanto, melhorar a qualidade do embrião produzido poderia contribuir para melhorar a resposta dos embriões à criopreservação e, conseqüentemente, melhorar as taxas de prenhez e reduzir as perdas até o nascimento. Desta forma, vários estudos já demonstraram tentativas de melhoria nos sistemas de maturação e cultivo *in vitro*, que vão desde a modificação da fonte proteica do meio utilizado ou às condições da atmosfera da estufa, por exemplo (Sudano et al., 2011; Senna-Netto et al., 2020).

## **2.2 Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI)**

Os primeiros estudos utilizando a transferência intrafolicular de ovócitos surgiram da necessidade de buscar uma melhor condição para a maturação de ovócitos que era realizada em sistema *in vitro*. Isto porque, na época em que foi desenvolvida, os resultados utilizando o cultivo *in vitro* de gametas eram inconsistentes. A ideia era fornecer aos ovócitos um ambiente que fosse mais próximo do fisiológico, pois quanto mais natural o ambiente maior seria o sucesso em suprir as necessidades do ovócito e garantir o seu desenvolvimento posterior (Fleming et al., 1985). Este primeiro relato do uso da técnica (Fleming et al., 1985), foi feito injetando ovócitos de suínos e ratos em folículos suínos *in vitro*. Nesse estudo ovócitos das duas espécies foram injetados em folículos de 5-8 mm dissecados de ovários suínos obtidos em abatedouro. Após a injeção, os folículos foram submersos em meio de incubação, composto de TCM 199, 0,5% de BSA, 0,002% de piruvato, 10 UI de penicilina / mL e 10 µg de estreptomicina / mL, onde permaneceram por 12 (ratos) ou 30 h (porcos) em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>. Após 12 h no folículo, os ovócitos de rato permaneceram por

mais 10 h no meio de cultivo. Ovócitos sem cumulus, das duas espécies também foram cultivados em 0,5 mL de meio sob óleo mineral e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 30 (porco) e 10 h (rato). Após o cultivo, foi avaliada a maturação nuclear de todos os ovócitos. Os resultados demonstraram que o ambiente folicular suíno foi incapaz de regular a maturação dos ovócitos de ratos, pois apenas permitiu um ambiente suporte para sua maturação.

Esse mesmo grupo de pesquisa realizou a primeira tentativa de transferir ovócitos de bovinos e babuínos para o folículo dominante de ovuladoras das respectivas espécies e observaram a maturação, ovulação, fecundação e posterior desenvolvimento embrionário. É importante ressaltar que, no caso dos bovinos, as doadoras de ovócitos foram estimuladas por 4 dias com doses decrescentes de FSH (28 mg) e tiveram seus ovários removidos para que os ovócitos fossem aspirados dos folículos ovarianos. No que se refere a injeção propriamente dita em bovinos, os ovários foram expostos por uma incisão no flanco e entre 10 e 27 ovócitos foram injetados nas vacas ovuladoras. Para os babuínos, a injeção foi feita após a laparoscopia, e foram injetados de 10 a 27 ovócitos. Após 5 e 7 dias foi realizada a lavagem uterina em babuínos e bovinos, respectivamente. Das 14 fêmeas que ovularam, somente dois embriões foram recuperados (um de vaca e um de babuíno) e dois de uma única vaca (Fleming et al., 1985). Apesar do resultado, o estudo foi considerado um modelo de estudo para a interação folículo e ovócitos e também para produzir ovócitos mais capacitados.

Em 1991 Hinrichs et al. Realizaram a primeira transferência de ovócitos imaturos em equinos. A transferência dos ovócitos, obtidos de ovários de abatedouro, foi feita utilizando trocáter e cânula, colocados na parede abdominal na área do flanco ipsilateral ao ovário contendo o folículo pré-ovulatório. As éguas foram inseminadas no dia seguinte e, em uma delas o folículo foi aspirado 24 h após a injeção, dos 15 ovócitos injetados 12 foram recuperados com as células do cumulus expandidas. A lavagem uterina foi realizada 7 a 11 dias após a ovulação e os embriões foram recuperados de 7 das 15 éguas, sendo que em 4 delas o número de embriões excedeu as ovulações (2, 3, 4 e 7). Esses resultados confirmaram que a transferência de ovócitos imaturos para o folículo pré-ovulatório em éguas também permitiu a maturação, ovulação, fecundação e desenvolvimento embrionário na espécie.

Apesar dessa técnica não ser tão importante em humanos, uma vez que a maturação de ovócitos nessa espécie é rotineiramente realizada *in vivo*, Werner-von der Burg et al. (1993) relataram o primeiro caso de gravidez após transferência intrafolicular de gametas. Nesse caso, a paciente recebeu tratamento hormonal para estimulação ovariana e, posteriormente, os ovócitos foram obtidos por aspiração folicular transvaginal. Os espermatozoides foram selecionados por meio da técnica de *swin-up* e juntamente com os

ovócitos foram injetados no folículo dominante com auxílio do ultrassom. Após 53 dias da transferência a gestação foi confirmada. A inseminação intrafolicular também foi relatada como sendo uma alternativa para vacas leiteiras que sofrem estresse térmico, e conseqüentemente, falha na ovulação, resultando na infertilidade das mesmas (López-Gatiús & Hunter, 2011).

Goudet et al. (1997) adaptaram a técnica para ser utilizada de forma menos invasiva em equinos, com o auxílio de um aparelho de ultrassom transvaginal. No estudo, os autores investigaram se a maturação de ovócitos aspirados e injetados no folículo pré-ovulatório de éguas ovuladoras seria semelhante àqueles maturados *in vitro*; e pela primeira vez, foi demonstrado nessa espécie que a maturação foi semelhante entre os tratamentos.

No ano seguinte, Bergfelt et al. (1998) realizaram experimentos visando desenvolver e validar a técnica em bovinos, utilizando a ultrassonografia transvaginal. As novilhas doadoras de ovócitos receberam aplicações de FSH duas vezes ao dia por 3 dias para induzir o crescimento múltiplo de folículos para a coleta dos ovócitos, que foi realizada 12 h após a última administração de FSH. Para injeção, 5 a 6 ovócitos foram utilizados, a ovulação foi induzida e os animais inseminados. Dois a três dias após a indução as fêmeas foram abatidas, as tubas uterinas retiradas e lavadas para a recuperação dos embriões. Dos 36 ovócitos injetados nas 7 ovuladoras, 16 estruturas foram coletadas e classificadas nos estágios de 3 (2), 4 (1), 6 (3) e 8 (2) células. Estas 8 estruturas foram coletadas de 3 ovuladoras, sendo que as demais não formaram embrião. Então, os autores consideraram que a técnica havia sido validada em bovinos. Entretanto, cabe ressaltar que os embriões estavam em estágio precoce de desenvolvimento e na tuba uterina, o que não garantia que os mesmos tivessem sido transportados para o útero e continuassem o seu desenvolvimento normal.

Apesar do potencial da TIFOI os estudos iniciais não tiveram continuidade, o que pode ter sido devido ao fato da técnica ser menos atrativa naquela época, dada a dificuldade de obtenção de ovócitos tanto em equinos como em bovinos.

Quase 20 anos após o primeiro estudo em equinos, novas tentativas de utilizar a técnica foram realizadas. Deleuze et al. (2009) investigaram a produção de embriões em éguas, após a transferência intrafolicular de ovócitos maturados *in vitro*. Para isso, compararam a produção de embriões após a transferência de ovócitos para o oviduto, após transferência intrafolicular imediata, e após transferência intrafolicular de ovócitos após a maturação *in vitro*. As éguas foram tratadas com eCG e aspiradas para a obtenção dos ovócitos, que foram maturados *in vitro* por 30 h ou preparados para a transferência intrafolicular imediata. A coleta de embriões foi realizada 10 dias após os procedimentos. A

taxa de recuperação embrionária após a transferência intraovidutal foi de 32,5% (13 de 40), diferente da taxa de 5,8% (3 de 52) observada no grupo de transferência intrafolicular após a maturação *in vitro*, e de 14,6% (6 de 41) do grupo transferência intrafolicular imediata.

A partir de 2015 as pesquisas voltadas à TIFOI em bovinos foram retomadas. No entanto, o contexto em termos de uso de biotécnicas reprodutivas em bovinos era totalmente diferente do que na década de 80. Apesar da PIV ser uma técnica comercialmente estabelecida, os problemas relacionados à qualidade desses embriões ainda não foram superados. Esses problemas, se se devem, principalmente, às perdas embrionárias e a maior sensibilidade desses embriões à criopreservação, caracterizada pelas menores taxas de gestação após a transferência de embriões congelados do que de as taxas de embriões frescos (Sanches et al., 2016). Portanto, a transferência intrafolicular de ovócitos resurge como uma alternativa para produzir um embrião mais próximo daquele produzido *in vivo*, evitando as várias alterações causadas pela condição *in vitro* que prejudicam o desenvolvimento embrionário e o estabelecimento da prenhez.

Kassens et al. (2015) realizaram um estudo para determinar as características do desenvolvimento de embriões derivados da transferência intrafolicular de ovócitos em comparação com embriões PIV e produzidos *in vivo*. Para a produção *in vivo* novilhas Simental foram superestimuladas e inseminadas com sêmen de um touro Holandês. Para a transferência intrafolicular de ovócitos, novilhas da raça Simental foram sincronizadas e aquelas com folículo igual ou maior que 9 mm foram inseminadas e receberam a injeção de 60 ovócitos obtidos de ovários de abatedouro e maturados *in vitro* por 16 a 22 h. A coleta de embriões foi realizada 7 dias depois. A taxa de recuperação de estruturas foi de 35,4%. Após a transferência para as receptoras, a taxa de prenhez aos 35 dias foi de 61,9% para embriões *in vivo*, 42,1% para aqueles embriões derivados da transferência intrafolicular. A taxa de nascimento para os grupos *in vivo* e cultivo com BSA foi a mesma observada para prenhez, já para o grupo da transferência intrafolicular a taxa de nascimento observada foi de 36,8%. Esse estudo foi o primeiro a demonstrar a transferência intrafolicular de ovócitos guiada por ultrassom, utilizando ovócitos derivados de abatedouro e maturados *in vitro*.

Sprícigo et al. (2016) realizaram um estudo utilizando a TIFOI como ferramenta para melhorar o aproveitamento de ovócitos vitrificados. Inicialmente, os autores avaliaram a possibilidade de produzir embriões via TIFOI a partir de ovócitos criopreservados. Posteriormente, foi feita a prova de conceito de que a técnica poderia ser utilizada para produzir embriões e crias saudáveis. Para isso, compararam a capacidade de desenvolvimento de embriões resultantes de ovócitos frescos e vitrificados/aquecidos e submetidos ao sistema

TIFOI ou *in vitro*. A taxa de recuperação embrionária e de estruturas resultantes da TIFOI foi 12,9% e 47,6% para ovócitos frescos e 0 e 12% para ovócitos vitrificados, quando excluído o ovócito nativo da ovuladora. Os autores demonstraram a produção de 12,9% de embriões utilizando a TIFOI e que esse seria equivalente a um terço dos embriões produzidos pela PIV, sugerindo mais estudos sobre fatores relacionados ao sucesso da técnica. Depois os autores utilizaram doadoras da raça Gir para obtenção dos ovócitos e ovuladoras da raça Nelore previamente sincronizadas para que no dia da TIFOI elas obtivessem um folículo pré-ovulatório igual ou maior que 10 mm. Foram transferidos 10 a 22 ovócitos para 6 ovuladoras e 8 dias depois realizou-se a coleta de embriões por lavagem uterina. A recuperação de estruturas foi de 21% e 5,5% de embriões, os quais foram transferidos para vacas receptoras, resultando na taxa de prenhez de 36%. No mesmo ano foi relatado o nascimento dos primeiros bezerros saudáveis produzidos pela TIFOI, utilizando ovócitos imaturos, sendo que dos 4 nascidos, 3 foram originados a partir dos ovócitos de doadoras Gir e um foi originado a partir do ovócito da vaca ovuladora (Sprícigo & Dode 2016).

Em 2017, Hoelker et al. Divulgaram o nascimento de bezerros saudáveis após transferência intrafolicular de ovócitos bovinos obtidos de ovários de abatedouro. No estudo, os autores determinaram o efeito do ambiente de maturação nas características de desenvolvimento embrionário, para determinar se a capacidade de desenvolvimento embrionário seria determinada pelo ambiente da maturação ou pela fonte dos ovócitos, provenientes de abatedouro. Para injeção utilizaram novilhas com folículo pré-ovulatório igual ou maior que 9 mm, e 50 ovócitos foram injetados juntamente com 200 µL de PBS. A coleta de embriões foi realizada 8 dias após a injeção. Os embriões resultantes da coleta e aqueles produzidos *in vitro* (controle) foram congelados, descongelados e transferidos para receptoras previamente sincronizadas. Os resultados mostraram uma taxa de recuperação de estruturas de 38,5%. A recuperação embrionária total foi de 17,3% e a taxa de prenhez foi de 15,4% (2 de 13). Os autores concluíram que os embriões TIFOI atingiram maiores taxas de desenvolvimento embrionário quando comparados àqueles embriões PIV e que isso teria o efeito positivo do ambiente folicular durante a maturação e qualidade intrínseca dos embriões fecundados. Além disso, o estudo foi o primeiro a relatar o nascimento de bezerros saudáveis após realizar a TIFOI com ovócitos de abatedouro.

Em 2019, Martinez de Andino et al. Realizaram a TIFOI em equinos para avaliar o efeito da transferência autóloga *versus* alogênica, como uma alternativa mais eficaz para a produção de embriões de doadoras com o trato reprodutivo comprometido. Os resultados confirmaram que ovócitos imaturos podem ser transferidos para o folículo pré-

ovulatório de éguas, serem maturados dentro do folículo, serem ovulados e manterem a competência meiótica e de desenvolvimento, mas não tem repetibilidade. De 54 ovócitos injetados na TIFOI, 36 (67%) foram recuperados e 56% destes estavam maduros, comparados a 49% daqueles que foram maturados *in vitro*. Além disso, a ovulação nas éguas com transferência autóloga foi de 9/13 (69%), sendo que apenas duas éguas produziram embriões e nenhum embrião extra resultante da TIFOI. Já para éguas com transferência alogênica, 10/11 (91%) ovularam, e 7 destas produziram embriões, sendo que 4 éguas produziram embriões resultantes da TIFOI. Com base nesses resultados os autores concluíram que a TIFOI não apresenta eficiência suficiente para ser utilizada clinicamente em equinos.

Recentemente, Andriikova et al. (2020), objetivaram desenvolver um novo conjunto de equipamentos para a TIFOI, uma vez que até então a técnica é realizada por duas pessoas: um profissional que posiciona a guia transvaginal e manipula o ovário até a posição ideal para a injeção, e outra pessoa realiza a injeção dos ovócitos propriamente dita, pressionando o êmbolo da seringa conectada à parte externa do sistema de injeção. O estudo comprovou a eficácia do sistema de injeção desenvolvido utilizando uma palheta de 0,25 µL entre a agulha e a seringa de injeção, mostrando uma diferença quando se utiliza um sistema onde os ovócitos são carregados em palheta de 15 ou 18 mm para ser realizada a injeção. O sistema de 18 mm proporcionou uma maior recuperação dos ovócitos (92,8) após serem injetados no folículo e aspirados novamente, *versus* 52,8% de recuperação utilizando o sistema com 15 mm no momento da injeção. Além disso, o posicionamento do bisel da agulha para baixo também proporcionou maior recuperação de ovócitos (97,5%). Das vacas que receberam a injeção de ovócitos, 86,7% ovularam (26/30) e após a lavagem uterina a taxa de recuperação de estruturas foi de 22,5%, e 10,1% de embriões. Esses resultados sugerem que a TIFOI pode ser uma alternativa para produção de embriões.

## **2.3 Fatores que podem afetar a produção de embriões pela TIFOI**

### **2.3.1 Desenvolvimento Folicular e Maturação Ovocitária**

Desde seu crescimento inicial ou ativação, até a formação do antro, o folículo independe da ação hormonal (Sun & Li, 2013), mas a partir de um diâmetro em torno de 3 mm o desenvolvimento folicular é dependente de gonadotrofinas, em bovinos (Fair, 2003). Nessa fase final de desenvolvimento, os folículos antrais são recrutados por ação do FSH e

continuam o seu desenvolvimento, até que apenas um seja selecionado para se tornar dominante e os demais entrem em atresia, formando o que se denomina onda de desenvolvimento folicular.

Durante a fase de seleção, apenas um folículo se torna dominante, em consequência de eventos bioquímicos intrafoliculares, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), concentração de estradiol no fluido folicular e quantidade de receptores de LH nas células da granulosa e teca (Ginther et al., 2003; Beg & Ginther, 2006). Quando um folículo responde de forma mais rápida ao pequeno aumento de FSH que inicia a onda folicular ocorre um aumento da proteína plasmática associada a gestação (PAPP-A). Esta proteína, é uma metalo proteína que degrada as proteínas ligadoras do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP-4 e -5), induzindo a um aumento no IGF livre que sinergiza com FSH para aumentar a produção de estradiol folicular. Esse aumento de estradiol exerce retroalimentação negativa sobre a secreção de FSH, impedindo o crescimento dos demais folículos (Fortune et al., 2004). Além disso, o folículo dominante passa a secretar inibina, que causa retroalimentação negativa sobre a secreção de FSH (Bungartz & Niemann, 1994).

Um fator chave para a seleção dos folículos dominantes é que possuem concentração mais elevada de mRNA para o receptor de LH nas células da teca e da granulosa quando comparados a folículos recrutados. A síntese de estradiol é dependente da estimulação gonadotrópica tanto da síntese de andrógenos quanto de sua aromatização, isso porque andrógenos produzidos nas células da teca, são aromatizados em estrógenos pelas células da granulosa. Com o surgimento de receptores de LH nas células da granulosa, ocorre o aumento da esteroideogênese, visto pelo aumento da expressão de mRNA para a enzima aromatase, proporcionando concentrações suficientes de estrógeno para promover o pico pré-ovulatório de LH para que ocorra a ovulação (Fortune, 1994). O pico pré-ovulatório de LH estimula a retomada da meiose e induz o rompimento do folículo e a ovulação (Ashkenazi et al., 2014).

A maturação é o estágio final da preparação do ovócito para a fecundação, e este processo envolve várias modificações nucleares e citoplasmáticas. Durante os estágios finais da foliculogênese, o ovócito deve sofrer alterações moleculares e celulares para adquirir sua competência e ser capaz de completar a maturação (Fair et al., 1995). A maturação nuclear *in vivo* dura aproximadamente 24 h (Luciano et al., 2009). Após o pico de LH, o ovócito deve permanecer por pelo menos 18 h dentro do folículo dominante e atingir o estágio de metáfase II (MII) (Sirard et al., 1989). A maturação nuclear se refere a retomada da meiose e progressão do estágio de prófase I até a MII. Sendo assim, o ovócito que apresentava o



núcleo em vesícula germinativa (VG), caracterizada pela membrana nuclear íntegra e cromatina descondensada (Liu et al., 2006), sofre a quebra da vesícula germinativa (VGBD), que nada mais é do que a dissolução da membrana nuclear, e então progride para os estágios de metáfase I (MI), anáfase I (AI) e telófase I (TI), completando a primeira divisão meiótica. Nesta fase, os cromossomos homólogos se separam e metade permanece no ovócito (célula haploide) e o restante é liberado no primeiro corpúsculo polar. A segunda divisão então inicia e evolui rapidamente para MII, estágio em que é mais uma vez retido até que ocorra a fecundação e, a meiose seja então finalizada com a liberação do segundo corpúsculo polar (Lonergan & Fair, 2016).

Além da maturação nuclear, o ovócito sofre maturação citoplasmática, que envolve a redistribuição de várias organelas celulares, incluindo grânulos corticais e mitocôndrias e que atribui a preparação para fecundação. Essa reorganização de organelas é mediada pelos microtúbulos e microfilamentos do citoesqueleto. As mitocôndrias se movem de uma posição cortical para mais central no ovócito, região de alto consumo de energia e são responsáveis pela produção de ATP, sendo que a atividade mitocondrial dos ovócitos varia durante a maturação (Jeseta et al., 2014). O complexo de Golgi é posicionado em uma área perinuclear e os grânulos corticais, produtos do complexo de Golgi, migram para a periferia do ovócito. Após a fecundação, os grânulos corticais se fundem com a membrana plasmática e liberam seu conteúdo no espaço perivitelínico, provocando mudanças estruturais na zona pelúcida, bloqueando a poliespermia (Sirard et al., 2006). Todos esses eventos devem ocorrer de forma orquestrada (Magnusson et al., 2008), pois quando ocorre assincronia entre a maturação nuclear e a citoplasmática os ovócitos podem não ser fecundados ou não ter desenvolvimento embrionário satisfatório.

Sendo assim, quando os ovócitos são utilizados na TIFOI, deve-se garantir que os mesmos sofram todos esses processos de forma sincrônica, para que a maturação, fecundação e posterior desenvolvimento embrionário não sejam prejudicados. Para isso, os ovócitos devem ter adquirido a competência antes de serem aspirados dos folículos e injetados no folículo dominante da ovuladora e, durante a sua permanência no folículo após a TIFOI, deve ocorrer a retomada e término da primeira divisão meiótica. Para a retomada da meiose *in vivo*, o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) induz uma mudança nos níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), induzindo a ativação do fator promotor da meiose (MPF) (Van Den Hurk et al., 2005). Altos níveis de AMPC no ovócito bloqueiam o MPF e o ovócito permanece retido em profase I. Após o pico de LH ocorre o pico transitório de AMPC intrafolicular, levando a diminuição na concentração de guanosina monofosfatada

cíclica (GMPc), diminuindo o efeito inibitório da fosfatidilesterase 3A (PDE3A), específica do ovócito. Por fim, a liberação da ação da PDE3A induz a diminuição da concentração de AMPc (Vaccari et al., 2009), o que é essencial para defosforilação da proteína quinase A (PKA) e ativação do MPF, responsável pela retomada da meiose (Tripath et al., 2010).

Na TIFOI, acredita-se que os ovócitos são expostos aos eventos induzidos pelo LH, podendo retomar e completar a meiose de forma semelhante ao que acontece fisiologicamente, desde que sejam manipulados em líquido folicular e/ou expostos a inibidores de meiose, para evitar a queda nos níveis de AMPc e a retomada da meiose (Gilchrist et al., 2016). Ou seja, é necessário utilizar algum fator inibidor da meiose no meio em que os ovócitos serão aspirados e mantidos até a injeção no folículo dominante. Dessa forma, é possível que os ovócitos suportem a maturação, da mesma maneira que na ovulação simples. No entanto, vários trabalhos utilizaram PBS para manipular e para injetar os ovócitos no folículo pré-ovulatório e isso parece não ser o principal fator que afeta a maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário dos ovócitos submetidos à TIFOI.

Vale destacar que além de garantir que esses eventos ocorram após a injeção dos ovócitos no folículo pré-ovulatório, é importante esclarecer se o tempo em que os ovócitos permanecem no folículo é suficiente para que ocorram esses eventos, ou se o tempo proporcionaria o envelhecimento dos mesmos.

### **2.3.2 Ovulação**

O pico de LH causa, além da retomada da meiose, o rompimento da parede folicular do folículo pré-ovulatório. O mecanismo responsável por esse rompimento é semelhante a uma reação inflamatória, isso porque envolve a ação de proteases na remodelação do tecido, presença de células do sistema imune, prostaglandinas e agentes de estresse oxidativo. Os inibidores de proteases reduzem os danos nos tecidos que circundam o folículo durante a degradação do ápice folicular. Já as células leucocitárias atuam através da liberação de enzimas que digerem a matriz extracelular e propiciam a remodelação do folículo (Bukulmez & Arici, 2000). As interleucinas, que são citocinas presentes durante a ovulação, regulam a atividade das células foliculares, síntese de proteases e prostaglandinas (Hurwitz et al., 1993).

Após a ruptura do folículo, os ovócitos são liberados na cavidade abdominal e precisam ser captados pelas fimbrias do oviduto para serem transportados até a junção istmo/

ampola, para que ocorra a fecundação (Hafez & Hafez, 2004). Isso ocorre no processo normal de ovulação, onde apenas um ovócito é liberado. No entanto, na TIFOI mais ovócitos são injetados no folículo, e ainda não foi relatado se a quantidade de ovócitos injetados afeta a ovulação.

Vale ressaltar que, quando a injeção de ovócitos é realizada, o folículo pré-ovulatório é perfurado e um volume de líquido é injetado juntamente com os ovócitos. Esse volume de líquido e número de ovócitos pode variar, segundo os trabalhos que já utilizaram a transferência intrafolicular de ovócitos imaturos ou maturos *in vitro* em bovinos, assim como o número de ovócitos injetados (Kassens et al., 2015; Sprícigo et al., 2016; Hoekler et al., 2017).

### 2.3.3 Transporte de gametas e embriões

Após a ovulação, o ovócito permanece viável por cerca de 8 a 10 h, e o espermatozoide por 18 a 50 h no trato reprodutivo da vaca. Portanto, a sincronia entre o tempo de exposição dos dois gametas deve garantir que a fecundação ocorra e, para isso, um número adequado de espermatozoides deve estar disponível no reservatório do oviduto quando ocorrer a ovulação (Harper, 1994; Anderson, 1991).

O transporte de espermatozoides pelo trato reprodutivo da fêmea envolve uma série de eventos. Quando se utiliza a monta natural, milhões de espermatozoides são ejaculados e, após a passagem pela cérvix e o útero, somente milhares chegam ao istmo do oviduto, e apenas um pequeno número chega à ampola no momento da fecundação (Yaniz et al., 2000). No istmo, os espermatozoides se ligam às células do mesmo e, conforme se capacitam, são liberados. Este reservatório garante a viabilidade dos espermatozoides, garantindo sua capacidade de fecundação e disponibilidade até o momento da ovulação (Yaniz et al., 2000; Miller, 2015).

O transporte de gametas através do oviduto é favorecido pela composição do epitélio tubárico, no qual células epiteliais secretoras e ciliadas proporcionam um ambiente favorável para a manutenção da viabilidade dos gametas, a fecundação e o desenvolvimento inicial do embrião (Hunter et al., 2014). Este ambiente varia conforme a fase do ciclo estral, assim como o fluido tubárico, de forma que as células ciliadas participam da formação dos reservatórios para os espermatozoides e da captação do ovócito, e as células secretoras são responsáveis pela formação do fluido tubárico (Suarez et al., 2004; Coy et al., 2010; Lamy et

al., 2016). O batimento ciliar e a contração da musculatura lisa da tuba auxiliam o transporte espermático, em resposta ao estradiol, na fase de estro. Por outro lado, na fase luteínica as contrações diminuem, em resposta à progesterona, resultando no transporte lento do embrião até o útero (Cerny et al., 2015). Vale ressaltar que, caso a concentração hormonal seja alterada nessas fases do transporte dos gametas ou do embrião, pode ocorrer a retenção do zigoto na junção istmo-ampola (baixas níveis de estrógeno) ou o transporte rápido para o útero (altos níveis de estrógeno) (Anderson, 1991).

Na TIFOI, ainda não foi esclarecido se o transporte de ovócitos e embriões pode ser afetado após a técnica, mas levando em consideração que mais de um ovócito é ovulado pelo folículo pré-ovulatório, esse é um processo que ainda precisa ser esclarecido. Com relação a esse aspecto, já foi demonstrado que ovócitos de vacas superovuladas passam pelos ovidutos de maneira mais rápida do que em vacas com ovulação simples, ou seja, mais de um ovócito sendo captado pelas fímbrias do oviduto (Hawk, 1988)). Essa taxa de passagem pode ser reduzida em um dia, mas a proporção de vacas superovuladas com transporte acelerado do ovócito não é conhecida, e as consequências do transporte rápido na sobrevivência dos embriões não foram determinadas (Hawk, 1988).

#### **2.3.4 Ambiente folicular**

A qualidade do ovócito pode ser afetada pelo ambiente em que eles são expostos durante a maturação. Modificações realizadas no ambiente de maturação *in vitro*, tais como hormônios, antioxidantes, fatores de crescimento, temperatura, atmosfera gasosa e suplementação energética, são feitas visando oferecer condições ao ovócito para expressar o seu potencial, mimetizando o ambiente folicular. Nesse sentido, deve-se considerar que quando os ovócitos são retirados do ambiente folicular, o requerimento para desenvolvimento ovocitário depende do estágio fisiológico do folículo o qual ele foi retirado (Wrenzycki & Stinshoff, 2013).

Um das alternativas para se obter melhores resultados quanto à maturação ovocitária, eliminando os problemas que podem ocorrer na MIV, seria expor os ovócitos a um ambiente de maturação *in vivo*. Assim, alguns trabalhos citam como alternativa a utilização da TIFOI, ou seja, a injeção de ovócitos imaturos no folículo pré-ovulatório de uma vaca ovuladora, sendo uma condição de ambiente folicular natural e em condições ideais para a maturação (Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017). Vale ressaltar que o ambiente folicular

*in vivo* está diretamente relacionado à idade, escore de condição corporal e à dieta que as vacas são submetidas (Leroy et al., 2005; Sinclair et al., 2008; Bender et al., 2010). Ainda não se sabe o efeito da injeção dos ovócitos no ambiente folicular, ou seja, se isso altera o ambiente folicular, desde sua composição bioquímica, alterando a concentração de metabólitos, até a própria resposta imune, alterando a produção de citocinas, por exemplo.

Alguns trabalhos demonstraram que a concentração de estradiol (E2) e progesterona (P4) presentes no folículo dominante, influenciam na concentração de metabólitos, os quais são essenciais para garantir que o ovócito sofra a maturação completa e que possa ser fecundado e se desenvolver em embrião (Leroy et al., 2005; Vanholder et al., 2005; Sinclair et al., 2008; Bender et al., 2010). Além disso, em vacas pós-parto, foi demonstrado que a concentração de alguns metabólitos no fluido folicular pode afetar a qualidade dos ovócitos e as células da granulosa (Leroy et al., 2004<sup>a</sup>; 2004b). Foi mostrado que a composição de ácidos graxos do fluido folicular de vacas leiteiras é diferente a do plasma, e que é dependente da atividade estrogênica (Renaville et al., 2008). No entanto, num estudo realizado sobre a concentração de metabólitos presentes no fluido folicular em vacas de alta produção e novilhas da raça Holandesa, foi demonstrado que as diferenças na composição do fluido folicular entre vacas e novilhas não são devidas ao tamanho do folículo ou diferenças na concentração de E2, mas sim pela atividade metabólica das células foliculares (Bender et al., 2010).

Ainda sobre o ambiente folicular, a produção de citocinas no ovário, seu acúmulo no folículo ovariano e seu efeito em alguns processos ovarianos sugerem que essas moléculas podem ser importantes reguladores autócrinos e parácrinos das funções ovarianas (Qiao & Feng, 2011). Elas constituem potentes moduladores da resposta imunológica e, portanto, parecem estar envolvidas no sucesso e na falha reprodutiva (Smolikova et al., 2012). O sistema de interleucina-1 (IL-1) consiste em IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e está envolvido em eventos associados à ovulação, como a síntese de proteases e produção de prostaglandinas e óxido nítrico (Ellman et al., 1993; Dinarello, 1998). Além disso, a IL-1 regula a esteroidogênese e tem efeitos sobre as vias da cascata ovulatória, como a síntese de progesterona (Gérard et al., 2004). Ademais, entre outras citocinas estão IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, que podem ser produzidas pelas células foliculares ou por leucócitos infiltrados no folículo pré-ovulatório (Bukulmez & Arici, 2000).

### 2.3.5 Preparação da vaca ovuladora

Para a TIFOI, a vaca ovuladora deve receber os ovócitos aspirados de vacas doadoras. Para isso, a ovuladora precisa ter as condições necessárias e seus folículos devem estar em estágio fisiológico específico, garantindo um ambiente folicular para que o ovócito sofra a maturação, posteriormente ocorra a ovulação normal e os ovócitos possam ser captados pelas fimbrias do oviduto. Para isso, os autores têm utilizado protocolos de sincronização hormonal que garantem folículos no estágio de desenvolvimento desejado. Apesar das diferenças nos protocolos hormonais citados pelos autores que utilizaram a TIFOI, todos foram realizados com o mesmo objetivo de garantir que no momento na injeção de ovócitos as ovuladoras tivessem apenas um folículo dominante ou pré-ovulatório presente num dos ovários (Kassens et al., 2015; Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017).

O protocolo de sincronização para a TIFOI utilizado por Sprícigo et al. (2016) foi baseado no uso de implante de progesterona (P4), benzoato de estradiol (BE), análogos da prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) e do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Já os protocolos utilizados por Kassens et al. (2015) e Hoelker et al. (2017), preconizaram a utilização de análogos da PGF2 $\alpha$  e GnRH.

No trabalho realizado por Kassens et al. (2015) foi utilizado um protocolo de sincronização onde foi realizada a administração de 500 mg de cloprostenol, seguida pela administração de 0,02 mg de GnRH 48 h depois, e após 11 dias receberam a segunda administração de cloprostenol seguida por outra de GnRH e 42 h depois, para induzir a ovulação 24 a 28 h após. Depois de 16 h, as novilhas com folículo igual ou maior que 9 mm foram inseminadas e receberam a injeção de ovócitos 16 a 22 h após a administração de GnR. Portanto, o momento da injeção dos ovócitos foi sincronizado com a maturação *in vitro* por 16 a 22 h. Utilizando este protocolo, os autores mostraram 35,4% de recuperação de estruturas e 4,9% de recuperação embrionária.

No trabalho de Sprícigo et al., (2016), para a sincronização, no dia 0 utilizou-se implante de P4 e benzoato de estradiol (BE); no dia 8 retirou-se o implante de P4 e fez-se a administração de um análogo de PGF2 $\alpha$ , no dia 9 administrou-se metade da dose de BE utilizada antes, e 52 a 54 h após a retirada do implante, fez-se a TIFOI e a indução da ovulação com GnRH. Assim, os ovócitos permaneceriam por pelo menos 20 h dentro do folículo, considerando o momento da retirada do implante de P4 e da utilização do BE. Os autores obtiveram 12,9% de embriões e 47,6% de estruturas.

No trabalho de Hoelker et al., (2017), novilhas foram sincronizadas de acordo com o protocolo utilizado por Kassens et al., 2015, com pequenas adaptações. A segunda dose de GnRH foi administrada 40 h após a segunda dose de cloprostenol e a inseminação artificial foi realizada 36 h após. Então, a TIFOI foi realizada imediatamente após a inseminação, num intervalo máximo de 24 h. Desta maneira, os ovócitos foram injetados no folículo pré-ovulatório antes da indução da ovulação. A taxa de recuperação embrionária foi de 17,3% e de estruturas foi de 35,5%.

É importante salientar que conhecendo a dinâmica folicular das vacas ovuladoras, sabe-se que após a utilização de um implante de progesterona juntamente com o BE, uma onda de crescimento folicular é iniciada três ou quatro dias depois e conseqüentemente ocorre o recrutamento de vários folículos (Baruselli et al., 2011). Após o recrutamento tem-se a seleção e dominância folicular, onde a presença de um folículo maior inibe o crescimento dos demais. Este folículo dominante produz altas concentrações de estrógeno, que estimula o LH na hipófise e desencadeia o pico pré-ovulatório, para que ocorra a ovulação (Ginther et al., 1989; Aerts & Bols, 2010). Deve-se considerar que a ovulação só ocorre quando as concentrações de progesterona diminuem para que a inibição de LH seja reduzida, através do aumento nas concentrações de E2 no interior do folículo. Por isso, utiliza-se PGF2 $\alpha$  no oitavo dia do protocolo hormonal e BE no dia 9. Assim, espera-se que as ovuladoras tenham o pico pré-ovulatório de LH 16-18 h após a aplicação do BE e ovulem entre 27 e 30 h após o pico de LH (Hanlon et al., 1997). Assim, realizando a injeção intrafolicular 52 a 54 h após a remoção do implante de progesterona, os ovócitos ficarão tempo suficiente no folículo para retomar completar a meiose e então serem ovulados, fecundados e se desenvolverem em embriões (Sprícigo et al., 2016).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.180-187, 2010.
- ANDERSON, G.B. **Fertilization, early development, and embryo transfer**. In: CUPPS, P.T. *Reproduction in domestic animals*. 4 ed., San Diego: Academic Press, 1991. p.279-313.
- ANDRLIKOVA, M.; BINA, V.; KOS, V.; LOPATAROVA, M.; MARKOVA, B.; STENCLOVA, L.; CECH, S. Intrafollicular oocyte transfer in cattle – a technical report. **Acta Veterinaria Brno**. v. 89, p. 11-17, 2020.
- ASHKENAZI, H.; CAO, X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M.; TSAFRIRI, A. Epidermal Growth Factor Family Members: Endogenous Mediators of the Ovulatory Response. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 77–84, 2014.
- AUSTIN, E. J.; MIHM, M.; RYAN, M. P.; WILLIAMS, D. H.; ROCHE, J. F. Effect of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 2219–2226, 1999.
- BARROS, C. M.; BASTOS, M.R.; GUARDIEIRO, M.M.; CARVALHO, J.O.; FRANCO, M.M.; MOURÃO, G.B.; BARROS, C.M.; SARTORI, R. Improvement of a superovulatory protocol in Nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. **Reproduction Fertility Development**, v.20, n. 1-4, p.152, 2008.
- BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C. M.; RODRIGUES, C. A.; BÓ, G. A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1583-1593, 2011.
- BARUSELLI, P. S.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S AYRES, H.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; ARRUDA, R.P. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3 p.374-381, 2007.
- BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.T.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BO, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006b.



BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v.132, p. 365-377, 2006.

BENDER, K.; WALSH, S.; EVANS, A.C.; FAIR, T.; BRENNAN, L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. **Reproduction**, v. 139, n. 6, p. 1047–55, 2010.

BÉNYEI, B.; BARROS, C.C.W. Efeito da superovulação sobre o desempenho de bovinos doadores de embrião importados de clima temperado para clima tropical nos dois primeiros anos de adaptação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 4, p. 2000.

BERGFELT, D.R.; BROGLIATTI, G.M.; ADAMS, G.P. Gamete recovery and follicular transfer (graft) using transvaginal ultrasonography in cattle. **Theriogenology**, v.50, p.15-25, 1998.

BLONDIN, P. Status of embryo production in the world. **Animal Reproduction**, v. 12, p. 356-58, 2015.

BÓ, G.A.; ROGAN, D.; MAPLETOFT, R.J. Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: what we have learned. **Theriogenology**, v. 112, p. 26-33, 2018.

BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 81, p. 38-48, 2014.

BONILLA, L.; BLOCK, J.; DENICOL, A.C.; HANSEN, P.J. Consequences of transfer of an in vitro-produced embryo for the dam and resultant calf. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 229-239, 2014.

BRUM, D. S.; LEIVAS, F. G.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B.; RAUBER, L. P.; FIALHO, S. S.; PILLA, L. F. C.; BERNARDI, M. L. The effects of the number of oocytes and the volume of maturation medium in bovine in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, v.2. n.1, p.70-73, 2005.

BUKULMEZ, O.; ARICI, A. Leukocytes in ovarian function. **Human Reproduction Update**, v. 6, p. 1–15, 2000.

BUNGARTZ, L.; NIEMANN, H. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.583-91, 1994.

CALLEJAS, S.S.; ALBERIO, R.; CABODEVILA, J.A.; DULOUT, F.; ALLER, J.; TERUEL, M. Ovarian stimulation with FSH-P in single dose in polyvinylpyrrolidone or the combination of a reduced dose of FSH-P and eCG. **Revista Argentina Producción Animal**, v. 22, p. 141-151, 2002.

CARVALHO, P.D.; HACKBART, K.S.; BENDER, R.W.; BAEZ, G.M.; DRESCH, A.N.; GUENTHER, J.N.; SOUZA, A.H.; FRICKE, P.M. Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: a preliminary study. **Theriogenology**, v. 82, n. 3, p. 481-849, 2014.

CAVALIERI, F. L. B.; ANDREAZZI, M. A.; COLOMBO, A. H. B.; EMANUELLI, I. P.; MORESKI, D. A. B.; et al. Estudo Sobre o Cultivo In Vitro de Embriões Bovinos Durante o Transporte. **Ars Veterinaria**, v. 31, n. 1, p. 07-11, 2015.

CERNY, K.L.E.; GARRETT, A.J. WALTON, L.H.; ANDERSON, P. J. BRIDGES. A transcriptomal analysis of bovine oviductal epithelial cells collected during the follicular phase versus the luteal phase of the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 84, 2015.

CHASOMBAT, J.; SAKHONG, D.; NAGAI, T.; PARNPAI, R.; VONGPRALUB, T. Superstimulation of follicular growth in Thai native heifers by a single administration of follicle stimulating hormone dissolved in polyvinylpyrrolidone. **Journal of Reproduction and Development**, v.59, n. 2, p. 214-218, 2013.

COY, P.; LLOYD, R.; ROMAR, R.; SATAKE, N.; MATAS, C.; GADEA, J.; HOLT, W.V. Effects of porcine pre-ovulatory oviductal fluid on boar sperm function. **Theriogenology**, v. 4, n. 74, p. 632-642, 2010.

CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1375-85, 2001.

DELEUZE, S.; GOUDET, G.; CAILLAUD, M.; LAHUEC, C.; DUCHAMP, G. Efficiency of embryonic development after intrafollicular and intraoviductal transfer of in vitro and in vivo matured horse oocytes. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 203-209, 2009.

DEMETRIO, D.; MAGALHÃES, A.; OLIVEIRA, M.; SANTOS, R.M.; CHEBEL, R.C. In vivo-derived embryo pregnancy rates at Maddox Dairy from 2008 to 2018. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 32, n. 2, p. 130-131, 2019.

DEMETRIO, D.G.B.; BENEDETTI, E.; DEMETRIO, C.G.B.; FONSECA, J.; OLIVEIRA, M.; MAGALHAES, A.; SANTOS, R.M. How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced *in vitro*? (12 years of practical results at a California dairy farm). **Animal Reproduction**. v. 17, n. 3: e20200053, p. 1-13, 2020.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. **International Reviews Immunology**, v.16, p. 457-99, 1998.

EALY, A. D.; WOOLDRIDGE, L.K.; MCCOSKI, S.R. BOARD INVITED REVIEW: Post-transfer consequences of *in vitro*-produced embryos in cattle **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 6, p. 2555-2568, 2019.

ELLMAN, C.; CORBETT, J. A.; MISKO, T. P.; MCDANIEL, M.; BECKERMAN, K. P. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced cellular cytotoxicity in the rat ovary. A potential role for nitric oxide in the ovulatory process. *J Clin Invest*, v. 92, p. 3053-3056, 1993.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.203-216, 2003.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Mol. Reprod. Dev**, v. 42, p. 437-42, 1995.

FARIN, C.E.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, P.W. Expression of messenger RNAs for insulin-like growth factors and their receptors in bovine fetuses at early gestation from embryos produced in vivo or in vitro. **Theriogenology**, v. 74, p. 1288-1295, 2010.

FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A.; FARIN, C.E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 178-191, 2006.

FLEMING, A. D.; SALGADO, R.; KUEHL, T. J. Maturation of baboon or cow oocytes transplanted into a surrogate dominant follicle *in vivo*. **Theriogenology**, v.23, p.193, 1985.

FLEMING, A.D; KUEHL, T.J.; ARMSTRONG, D.T. Maturation of pig and rat oocytes transplanted into surrogate pig follicles in vitro. **Gamete Research**, v. 11, p. 107-119, 1985.

GASPAR, R. C.; ARNOLD, D. R.; CORREA, C. A.; DA ROCHA, C. V. J. R.; PENTEADO, J. C.; DEL COLLADO, M.; VANTINI, R.; GARCIA, J. M.; LOPES, F. L. Oxygen tension affects histone remodeling of in vitroproduced embryos in a bovine model. **Theriogenology** 2015; 83:1408-15. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.01.002.

GÉRARD, N.; CAILLAUD, M.; MARTORIATI, A.; GOUDET, G.; LALMANACH, A. C. The interleukin-1system and female reproduction. **J Endocrinol**, v. 180, p. 203-12, 2004

GILCHRIST, R. B.; LUCIANO, A. M.; RICHANI, D.; ZENG, H. T.; WANG, X.; VOS, M. D.; SUGIMURA, S.; SMITZ, J.; RICHARD, F. J.; THOMPSON. J. G. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction**, v.152, p. 143-157, 2016.

GINTHER, O. J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 239–257, 2003.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Journal of Animal Reproduction Science**, v. 20, n. 3, p. 187-200, 1989.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.B.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.212-217, 2007.

GONZALEZ, A.; WANG, H.; CARRUTHERS, T.; MURPHY, B.; MAPLETOFT, R. Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. **Theriogenology**, v. 41, p. 1631-1642, 1994.

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 Veterinary Journal Supplement**, n. 25, p. 54-59, 1997.

GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. **Nordisk Veterinaraermedicin**, v.35, p.408-21, 1983.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução animal. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HANLON, D. W.; WILLIAMSON, N.B.; WICHTEL, J.J. Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 963-975, 1997.

HANSEN, P. J. Implications of assisted reproductive technologies for pregnancy outcomes in mammals. **Annual Review Animal Biosciences**. v. 8, n. 1, 2020.

HAPER, M.J.K. **Gamete and zygote transport**. In: The physiology of reproduction. 1994; 1(2ed) KNOBIL, E.; NEILL, D. J. 1994. p.123-187.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v.43, p.151-152, 1995.

HASLER, J. F. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v.81, p.152-69, 2014.

HAWK, H.W. Gamete transport in the superovulated cow. **Theriogenology**, v.29, n.1, 1988.

HINRICHS, K.; DI GIORGIO, L.M. Embryonic development after intrafollicular transfer of horse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 44, p. 369-374, 1991.

HOELKER, M.; KASSENS. A.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI, C.; TESFAYE, D.; NEUHOFF, C.; SCHELLANDER, K.; HELD- HOELKER, E. Birth of healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 15; n. 97, p. 41-49, 2017.

HUNTER, R. H. F.; GADEA, J. Cross-talk between free and bound spermatozoa to modulate initial sperm: egg ratios at the site of fertilization in the mammalian oviduct. **Theriogenology**, v. 82, n. 3, p. 367-372, 2014.

HURWITZ, A.; DUSHNIK, M.; SOLOMON, H.; BEN-CHETRIT, A.; FINCI-YEHESKELZ, MILWIDSKY, A.; MAYER, M.; ADASHI EY.; YAGEL S. Cytokine-mediated regulation of rat ovarian function: interleukin-1stimulates the accumulation of a 92-kilodalton gelatinase. **Endocrinology**, v.132, p. 2709-2714, 1993.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 109-126, 2004.

JESETA, M.; CTVRTLKOVA KNITLOVA, D.; HANZALOVA, K. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic competence related to their in vitro maturation. **Reproduction in domestic animals**, v. 49, n. 3, p. 469–75, 2014.

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, 2015.

KRUIP, T.A.M.; DEN DAAS, J.H.G. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology**, v. 47, p. 43-52, 1997.

KUZMANY, A.; HAVLICEK, V.; WRENZYCKI, C.; WILKENING, S.; BREM, G.; BESENFELDER, U. Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. **Theriogenology**, v. 75, p. 482–94, 2011.

LAMY, J.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; TSIKIS, G.; MERMILLOD, P.; SAINT-DIZIER, M. Regulation of the bovine oviductal fluid proteome. **Reproduction**, v. 152, n.6, p. 629-644, 2016.

LASTER D. Disappearance of and uptake of I125 FSH in the rat, rabbit, Ewe and cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 407-415; 1972.

LEROY, J. L.; GENICOT, G.; DONNAY, I.; VAN SOOM, A. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 1, p. 76-78, 2005.

LEROY, J. L.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.V.; BOLS, P.; DEWULF, J.; DE KRUIF, A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high yielding dairy cows early post partum. **Theriogenology**, v. 62, p. 1131–1143, 2004a.

LEROY, J. L.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.V.; BOLS, P.; DEWULF, J.; DE KRUIF, A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 201–211, 2004b.

LIU, Y.; SUI, H.; WANG, H.; YUAN, J. Germinal Vesicle Chromatin Configurations of Bovine Oocytes. **Microscopy research and technique**, v. 69, p. 799–807, 2006.

LONERGAN, P.; FAIR, TRUDREE. Maturation of oocytes in vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 255–268, 2016.

LOONEY, C.; BONDIOLI, K.; HILL, K.; MASSEY, J. Superovulation of donor cows with bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) produced by recombinant DNA technology. **Theriogenology**, v. 29, 271, 1988.

LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R.H.F. Intrafollicular insemination for the treatment of infertility in the dairy cow. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1695-1698, 2011.

LUCIANO, A. M.; CHIGIONI, S.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; LUVONI, G. C.; MODINA, S. C. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. **Cryobiology**, v. 59, p. 90-95, 2009.

MACHADO, G. M.; FERREIRA, A. R.; PIVATO, I.; FIDELIS, A. S.; SPRÍCIGO, J. F. W.; PAULINI, F.; LUCCI, C. M.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. Post-hatching development of in vitro bovine embryos from day 7 to 14 in vivo versus in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, p. 936-47, 2013.

MAGNUSSON, V.; FEITOSA, W.B.; GOISSIS, M.D. et al. Bovine oocyte vitrification: Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.265-273, 2008.

MARTINEZ DE ANDINO<sup>1</sup>, E.V.; BROM-DE-LUNA, J.G; CANESIN, H.S.; RADER, K.; RESENDE, H.L.; RIPLEY, A.M.; LOVE<sup>1</sup>, C.C.; HINRICHS, K. Intrafollicular oocyte transfer in the horse: effect of autologous vs. allogeneic transfer and time of administration of ovulatory stimulus before transfer. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, V.36, P. 1237-1250, 2019.

MARTINS, C. M.; OLIVEIRA, L. G.; CREPALDI, G. A.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P.S. Efeito de diferentes doses de eCG na resposta superovulatória de doadoras Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 1237, 2007.

MATTOS, M. C.; NASTOS, M.R.; GUARDIEIRO, M.M.; CARVALHO, J.O.; FRANCO, M.M, MOURÃO, G.B.; BARROS, C.M.; SARTORI, R. Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. **Animal Reproduction Science**, v.125, p.119-23, 2011.

MILES, J. R.; FARIM, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, P.W. Angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced in vivo or in vitro. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1919-1926, 2004.

MILLER, D. J. Regulation of sperm function by oviduct fluid and the epithelium: insight into the role of glycans. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, p. 31-39, 2015.

MOORE, S.G.; HASLER, J.F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n.12, p. 10314-10331, 2017

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v.12, p.27-44, 1991.

POMAR, F. J.; TEERDS, K. J.; KIDSON, A.; COLENBRANDER, B.; THARASANIT, T.; AGUILAR, B.; ROE-LEN, B. A. J. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. **Theriogenology**, v. 63, p. 2254–68, 2005.

PONTES, J.H.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690-697, 2009.

QIAO, J.; FENG, H. L. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. **Hum Reprod Update**, v. 7, p. 17-33, 2011.

REESE, S.T.; FRANCO, G.A.; POOLE, R.K.; HOOD, R.; FERNADEZ MONTERO, L.; OLIVEIRA FILHO, R.V.; COOKE, R.F.; POHLER, K.G. Pregnancy loss in beef cattle: A meta-analysis. **Animal Reproduction Science**. v. 212, p. 1-11, 2020.

RENAVILLE, B.; BACCIU, N.; COMIN, A; MOTTA, M.; POLI, I.; VANINI, G.; PRANDI, A Plasma and follicular fluid fatty acid profiles in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 118–121, 2008.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of In Vitro Culture Conditions on Embryo Development and Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, (s4), p. 44-50, 2008.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 229 – 233, 2007

SANCHES, B.V.; LUNARDELLI, P.A.; TANNURA, J.H.; CARDOSO, B.L.; PEREIRA, M.H.C.; GAITKOSKI, G.; BASSO, A.C.; ARNOLD, D.R.; SENEDA, M.M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v. 85, p. 1147-1151, 2016.

SARTORI, R.; PRATA, A. B.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SANCHES, B. V.; PONTES, G. C. S.; VIANA, J. H. M.; PONTES, J. H.; VASCONCELOS, J. L. M.; PEREIRA, M. H. C.; DODE, M. A. N.; MONTEIRO JR, P. L. J.; BARUSELLI, P. S. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 13, p. 300-312, 2016.

SENA-NETTO, S. B.; SPRÍCIGO, J.F.W.; LEME, L.O.; GUIMARÃES, A.L.S.; CAIXETA, F.M.C.; DODE, M.A.N.; PIVATO, I. The Replacement of Fetal Bovine Serum with Bovine Serum Albumin During Oocyte Maturation and Embryo Culture Does Not Improve Blastocyst Quality After Slow Freezing Cryopreservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 18, p. 171-179, 2020.

SINCLAIR, K. D.; LUNN, L. A.; KWONG, W. Y.; WONNACOTT, K.; LINFORTH, R. S.; CRAIGON, J. Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in vitro embryo development. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 16, p. 859–868, 2008.

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

SIRARD, M. A.; FLORMAN, H. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; BARNES, F. L.; SIMS, M. L.; FIRST, N. L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.40, n. 6, p. 1257- 1263, 1989.

SMOLIKOVA, K.; MLYNARCIKOVA, A.; SCSUKOVA, S. Role of interleukins in the regulation of ovarian functions. **Endocrine. Regulations**, v. 46, p. 237-253, 2012.

SPRÍCIGO, J. F. W.; SENA NETTO, S. B.; MUTERLLE, C. V.; RODRIGUES, S. A. D.; LEME, L. O.; GUIMARÃES, A. S.; CAIXETA, F. M.; FRANCO, M. M.; PIVATO, I.; DODE, M. A. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 86, p. 2054–2062, 2016.

SPRÍCIGO, J.F.W.; DODE, M.A.N. Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI): Uma Boa alternativa para produção de embriões. **Documento 353**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília, DF, 2016.

SUAREZ, S. S. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 5-6, p. 455-462, 2004.

SUDANO, M. J.; CAIXETA, E. S.; PASCHOAL, D. M.; MARTINS JR, A.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; et al. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivoproduced blastocysts. **Reprod Fertil Dev**, v. 26, p. 1129–1141, 2014.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; MAGALHÃES, L.C.; CROCOMO, L.F.; DE LIMA-NETO, J.F.; LANDIM-ALVARENGA, F. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v.75, p.1211–1220, 2011.

SUN, J.; LI, X. Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture in vitro. **Reproductive Biology**, v. 13, n. 3, p. 221–228, 2013.

TAKAGI, M.; KIM, I.H.; IZADYAR, F.; HYTTEL, P.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.; VOS, P.L. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. **Reproduction**, v. 121, p. 941-821, 2001.

TAKEDOMI, T.; AOYAGI, Y.; KONISHI, M.; KISHI, H.; TAYA, K.; WATANABE, G.; SASAMTO, S. Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. **Theriogenology**, v. 43, n. 7, p. 1259-1268, 1995.

TRIBULO, A.; ROGAN, D.; TRIBULO, H.; TRIBULO, R.; ALASINO, R.V.; BELTRAMO, D.; BIANCO, I.; MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. **Animal Reproduction Science**, v. 129, p. 7-13, 2011.

TRIBULO, A.; TRIBULO, A.; ROGAN, D.; TRIBULO, H.; TRIBULO, R.; MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. **Theriogenology**, v. 77, p. 1679-1685, 2012.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V. P.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of cellular physiology**, v. 223, n. 3, p. 592–600, 2010.

VACCARI, S.; WEEKS, J. L.; 2ND, HSIEH, M.; MENNITI, F. S.; 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 WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; AERTS, B.J.; DEN DAAS, J.H. Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study. **Theriogenology**, v. 49, p. 883-894, 1998.

VANHOLDER, T.; LEROY, J. L.; SOOM, A.V.; OPSOMER, G.; MAES, D.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 33–44, 2005.



VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO, A.C.S.; SIQUEIRA, L.G.B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v.14, p.476-481, 2017

VIANA, J.H.M. 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. **Embryo Transfer Newsletter**, v.36, n. 4, p.8-25, 2018.

VIANA, J.H.M. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Divergent trends for IVD and IVP embryos. **Embryo Technology Newsletter**, v. 38, n. 4, p. 7-23, 2020.

WERNER-VON DER BURG, W.; COORDES, I.; HATZMANN, W. Pregnancy following intrafollicular gamete transfer. **Human Reproduction**, v. 8, n. 5, p. 771-774, 1993.

WRENZYCKI, C. In vitro culture systems: how far are we from optimal conditions? **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 279-282, 2016.

WRENZYCKI, C; STINSHOFF, H. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction in domestic animals**, v. 48 Suppl 1, p. 38-43, 2013.

YAMAMOTO, M.; OOW, M.; KAWAGUCHI, M.; SUZUKI, T. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in Polyvinylpyrrolidone. **Theriogenology**, v.41, n. 3, p.747-755, 1994.

YANIZ, J. L.; LOPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; MULLINS, K.J. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. **The Anatomical Record**, v. 260, n. 3, p. 268-278, 2000.

YOUNG, L.E.; SINCLAIR, K.D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v.3, n. 3, p. 155-163, 1998.

## CAPÍTULO 2

### **TRANSFERÊNCIA INTRAFOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS (TIFOI): CINÉTICA DE MATURAÇÃO NUCLEAR E NÚMERO DE OVÓCITOS INJETADOS**

Luzia Renata Oliveira Dias<sup>a</sup>; José Felipe Warmling Sprícigo<sup>b</sup>; Otávio Augusto Costa de Faria<sup>a</sup>; Venâncio Augusto Oliveira da Silva<sup>c</sup>; Felipe Manoel Costa Caixeta<sup>a</sup>; Ligiane de Oliveira Leme<sup>d</sup>; Andrei Antonioni Guedes Fidelis<sup>a</sup>; Ivo Pivato<sup>a</sup>; Margot Alves Nunes Dode<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup> Escola de Agricultura e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Biociência Animal, University of Guelph, ON, Canadá

<sup>c</sup> Docente ICESP, Brasília, DF, Brasil

<sup>d</sup> Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil, Alegre, ES, Brasil

<sup>e</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Reprodução Animal, Brasília, Distrito Federal, Brasil

**BRASÍLIA/DF**

**MARÇO DE 2021**

## 1 RESUMO

Com o objetivo de melhorar os resultados da transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI), dois experimentos foram realizados. No primeiro, foi avaliado se os ovócitos utilizados para TIFOI teriam a mesma cinética de maturação nuclear do que os ovócitos maturados *in vitro*. Ovócitos imaturos obtidos de ovários de abatedouro, foram injetados no folículo pré-ovulatório (TIFOI) de vacas ovuladoras (30 ovócitos/ ovuladoras) e mantidos no folículo por 8 (MIV8), 12 (MIV12) ou 16 h (MIV16), ou foram maturados *in vitro* (MIV) por 0, 8, 12 ou 16 h. A maturação nuclear foi similar entre os grupos Controle e TIFOI, uma vez que às 8 e 12 h de maturação a maioria dos ovócitos estava no estágio de metáfase I (MIV8= 69,4%; MIV12= 84,3%; TIFOI 8= 98,0%; TIFOI 12= 74,2%). Para avaliar a capacidade de desenvolvimento desses ovócitos, eles foram recuperados por ovum pick up (OPU) às 12 h após TIFOI e submetidos à fecundação *in vitro* (FIV) imediatamente após a OPU ou foram maturados *in vitro* por 4 h ou 10 h adicionais após a OPU. Os ovócitos controle foram maturados *in vitro* por 12, 16 e 22 h, antes de serem submetidos à FIV. A taxa de blastocistos no D7 foi semelhante ( $P > 0,05$ ) dentro do grupo MIV e dentro do grupo TIFOI, mas foi maior nos grupos MIV (MIV12= 35,4; MIV16= 36,7; MIV22= 40,7) em comparação com os grupos TIFOI (TIFOI 12= 18,8; TIFOI 16= 17,3; TIFOI 22= 21,6) ( $P < 0,05$ ). No segundo experimento, foi avaliado o efeito do número de ovócitos injetados na taxa de recuperação embrionária. Para isso a TIFOI foi realizada utilizando 10, 25 ou 50 complexos cumulus ovócitos (CCOs), e a quantidade e qualidade dos embriões obtidos após a TIFOI foram comparadas com as obtidas na produção *in vitro* (PIV). Embora a taxa de recuperação de estruturas (ovócito-embrião) tenha sido maior quando 50 CCOs (TIFOI 50= 41,0%) foram usados em comparação com 25 (28,4%) ou 10 (26,3%), a recuperação embrionária foi similar ( $P > 0,05$ ) entre os grupos TIFOI. Em conclusão, os ovócitos maturados por TIFOI mostraram maturação nuclear semelhante àqueles maturados *in vitro*, e nenhuma melhora na recuperação ou qualidade dos embriões foi observada. O tempo durante o qual os ovócitos permaneceram dentro do folículo após a TIFOI ou o número de ovócitos injetados no folículo não afetaram a taxa de recuperação e sua capacidade de serem fecundados e se desenvolverem em embriões.

**Palavras-chave:** blastocisto; desenvolvimento embrionário; injeção folicular; produção in vitro de embriões.

## 2 ABSTRACT

Aiming to improve the outcomes of intrafollicular transfer of immature oocytes (IFOT), two experiments were performed. First, we evaluated if the oocytes used for IFIOT would have the same nuclear maturation kinetics as the oocytes that were matured in vitro. The immature oocytes obtained from slaughterhouse ovaries were injected into the preovulatory follicles of ovulating cows (IFOT) and kept inside the follicle for 8, 12 or 16 h, or were matured in vitro for 0, 8, 12, or 16 h. The nuclear maturation was similar between the Control and IFOT groups, since at 8 or 12 h of maturation most oocytes were in the metaphase stage I (IVM8 = 69.4%; IVM12 = 84.3 %; IFIOT 8 = 98.0%; IFIOT 12 = 74.2%). For the evaluation of the developmental ability, oocytes were recovered by ovum pick up (OPU) at 12 h post IFIOT and submitted to in vitro fertilization (IVF) immediately after the OPU or were matured in vitro for additional 4 h or 10 h after OPU. Control oocytes were matured in vitro for 12, 16 or 22 h, before undergoing IVF. The rate of blastocysts at D7 was similar ( $P > 0.05$ ) within each groups, but the rate was higher in the IVM groups (IVM12 = 35.4; IVM16 = 36.7; IVM22 = 40.7) compared to the IFIOT groups (IFIOT 12 = 18.8; IFIOT 16 = 17.3; IFIOT 22 = 21.6) ( $P < 0.05$ ). In the second experiment, we evaluated the recovery rate of embryos after injecting 10, 25 or 50 cumulus oocytes complexus (COCs) during IFIOT. Although the recovery rate of ova was higher when 50 COCs (41.0%) were used, compared to 25 (28.4%) or 10 (26.3%), embryo recovery was similar ( $P > 0.05$ ) among IFIOT groups. In conclusion, oocytes matured by IFIOT showed similar nuclear maturation to those matured in vitro, and no improvement in embryo recovery or quality was observed. The time for which the oocytes remain inside the follicle after IFIOT or the number of oocytes injected into the follicles did not affect the recovery rate and their ability to be fertilized and to develop into embryos.

**Keywords:** blastocyst; follicular injection; IFIOT

### 3 INTRODUÇÃO

A produção de embriões é uma tecnologia importante para o melhoramento genético de rebanhos leiteiros e de corte, principalmente porque permite a propagação de características de fêmeas geneticamente superiores às demais do rebanho. Apesar da produção de embriões *in vivo* resultar em embriões de qualidade superior àqueles da produção de embriões *in vitro* (PIV), essa tecnologia passou a ser menos utilizada (Viana et al., 2017). Na PIV o ambiente artificial *in vitro* pode causar alterações nos embriões afetando a sua qualidade, e conseqüentemente, a sua taxa de prenhez. Além disso, esses embriões podem apresentar menor criotolerância do que aqueles produzidos no ambiente natural (Sudano et al., 2014).

Apesar de nas últimas décadas, a PIV comercial tenha tido avanços significativos (Sartori et al., 2016; Hansen et al., 2020), as taxas de blastocisto ainda estão em média de 40% (Sprícigo et al., 2016; Sena-Netto et al., 2020), juntamente com 40% de prenhez após a transferência (Sartori et al., 2016; Wrenzychi, 2016).

A produção de embriões através de uma técnica que possa proporcionar um ambiente semelhante ao fisiológico para a maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário, poderia ser uma alternativa para a melhorar a qualidade de embriões bovinos, e conseqüentemente melhorar na crioresistência e taxas de prenhez. Sendo assim, a transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) é uma técnica que preencheria esses requisitos, uma vez que proporciona um ambiente totalmente natural para a produção embrionária (Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017). Entretanto, apesar de alguns estudos terem mostrado que é possível obter embriões e bezerras saudáveis utilizando essa técnica, a taxa de recuperação embrionária após a TIFOI é considerada baixa (~ 10%) (Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017). Os fatores responsáveis por essa baixa recuperação são ainda desconhecidos, por isso, várias etapas da técnica devem ser estudadas e esclarecidas.

Dentre essas etapas, a injeção ou mais especificamente o número mais adequado de ovócitos que pode ser transferido para o folículo dominante sem que isso afete a ovulação e a recuperação embrionária, não está estabelecido. Além disso, não está bem

esclarecido se a maturação ovocitária ocorre após a transferência dos ovócitos imaturos no folículo ou se o tempo que os ovócitos permanecem no folículo é o suficiente para que completem a maturação, sejam fecundados e se desenvolvam em embriões. Portanto, é importante que estes fatores sejam esclarecidos para que a técnica seja melhorada.

Portanto, neste estudo dois experimentos foram delineados com o objetivo de identificar alguns dos fatores que podem afetar os resultados da TIFOI. Inicialmente foi avaliada a eficiência de maturação nuclear dos complexos cumulus ovócitos (CCOs) injetados e a funcionalidade desta maturação, observando o desenvolvimento embrionário posterior. Além disso, foi estudado o efeito do número de ovócitos injetados durante a TIFOI, na taxa de ovulação e na recuperação embrionária.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A menos que seja indicado, os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Todos os procedimentos em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA / Embrapa Recursos Genéticos Animais e Biotecnologia - Protocolo CEUA - Cenargen 006/2016).

### 4.1 Recuperação de ovócitos e maturação *in vitro*

Os ovários foram coletados em abatedouro local imediatamente após o abate e transportados para o laboratório em solução salina (0,9% NaCl) suplementada com penicilina G (100 UI / mL) e sulfato de estreptomicina (100 g / mL) a 36 °C. Os CCOs foram aspirados dos folículos (3 a 8 mm de diâmetro) com uma agulha hipodérmica (18 G) acoplada a uma seringa de 10 mL e transferidos para um tubo cônico de 15 mL. Após 10 minutos, o líquido folicular sobrenadante foi removido e centrifugado por 5 min a 700 × g. O líquido folicular foi utilizado para busca e seleção dos CCOs. Apenas CCOs com citoplasma homogêneo e pelo menos três camadas de células do cumulus foram usados para os experimentos. Os CCOs selecionados foram lavados e transferidos em grupos de 25-30 em gotas de 150 µL de meio de maturação *in vitro* (MIV) ou foram utilizados para TIFOI. O meio MIV consistindo em sais de Earle de TCM 199 (Gibco, Waltham, MA, EUA) foi suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS; Gibco, Waltham, MA, EUA), 0,1 mg / mL de L-glutamina 0,01 UI / mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 1 µM de piruvato, 1 µM de cisteamina e 0,075 mg / mL de sulfato de amicacina. Os ovócitos selecionados foram cultivados sob óleo mineral, a 38,8 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar.



## **4.2 Sincronização do ciclo estral e transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI)**

O protocolo utilizado para o TIFOI foi previamente descrito por Sprícigo et al. (2016). Resumidamente, novilhas da raça Nelore receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, São Paulo, Brasil) associado à aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol [intramuscular (im); (RIC-BE, São Paulo, São Paulo, Brasil)]. Oito dias depois, os animais receberam uma injeção de 2 mL (im) de um análogo de prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  [0,150 mg de d-cloprostenol (ARSA Prolise SRL, Argentina), e o dispositivo de progesterona foi removido. No dia seguinte, 1 mg de benzoato de estradiol (im) foi administrado. A injeção de ovócitos no folículo pré-ovulatório foi realizada 52-54 h após a remoção do dispositivo de progesterona. Foram utilizadas as ovuladoras que apresentavam um único folículo pré-ovulatório, maior que 10 mm de diâmetro.

Para a injeção intrafolicular foi utilizada uma guia transvaginal (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil), contendo uma probe convexa de ultrassom de 7,5 MHz (Aloka SSD 500, Tóquio, Japão). A guia transvaginal era composta por um mandril montado em um sistema fechado, tendo em uma extremidade uma seringa de insulina e uma agulha (27G, Uniever Unisis, Tóquio, Honshu, Japão) na outra extremidade. Primeiro, todo o sistema de injeção foi preenchido com PBS, e uma coluna de ar de aproximadamente 2 cm foi deixada no final. Os CCOs foram aspirados para dentro da agulha com no máximo 60  $\mu$ L de fluido folicular. Este sistema foi incorporado em uma guia transvaginal e posicionado no fórnix vaginal do mesmo lado do ovário contendo o folículo dominante. A agulha era então pressionada para perfurar o fórnix e a parede folicular. Após a agulha se tornar visível no antro folicular, o fluido folicular contendo os CCOs era injetado no folículo. Imediatamente após a injeção intrafolicular, 1 mL de análogo de GnRH (Gestran, Tecnopec, São Paulo, São Paulo, Brasil) foi administrado (im) para induzir a ovulação.

## **4.3 Avaliação do diâmetro folicular e da vascularização do fluxo sanguíneo com o Color Doppler**

O ultrassom (MyLab 30 Vet Gold, Esaote, Itália), equipado com uma sonda linear de 7,5 MHz, foi usado para avaliar o tamanho e a vascularização do folículo antes da TIFOI. A vascularização do fluxo sanguíneo foi classificada de acordo com Matsui &

Miyamoto (2009) como segue: 1- vascularização ausente, quando não foram observadas imagens coloridas ao redor do folículo; 2 - vascularização inicial, quando 20 a 40% do folículo era colorido; 3- vascularização intermediária, quando 41 a 60% do folículo era colorido; 4- vascularização intensa, quando 61 a 80% do folículo era colorido e vascularização 5- completa, quando 81 a 100% do folículo era colorido.

#### **4.4 Recuperação de ovócitos do folículo dominante após TIFOI**

Os ovócitos foram recuperados do folículo por aspiração folicular guiada por ultrassom. Resumidamente, uma guia transvaginal (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil) contendo uma sonda de ultrassom convexa de 7,5 MHz (Aloka, Tóquio, Japão) foi utilizado para as aspirações. A guia continha um mandril montado em um sistema fechado com uma agulha 18G, e na outra extremidade uma rolha de silicone era acoplada a um tubo cônico de 50 mL. Este tampão consistia de uma saída que era conectada a uma bomba de vácuo e calibrada a uma pressão de 30 mL / min. Após o preenchimento do sistema de aspiração com o meio de aspiração (PBS com 1% de SFB e 0,01 mg / mL de heparina), a guia era colocada no fórnix vaginal, no mesmo lado do ovário contendo o folículo dominante e todo o conteúdo folicular era aspirado. Após a aspiração, o conteúdo recuperado era lavado em um filtro coletor de embrião, e os ovócitos identificados utilizando-se estereomicroscópio (Zeiss-temi SV6, Jena, Alemanha).

#### **4.5 Avaliação da Maturação Nuclear**

Após a OPU, os ovócitos foram transferidos para uma gota de meio TCM suplementado com hialuronidase (0,2%). Todos os ovócitos foram desnudados, fixados em etanol e ácido acético glacial (3:1) por 48 h, e então corados com 1% de solução lacmoide em 45% de ácido acético glacial. O estágio de maturação de cada ovócito foi determinado usando microscopia de contraste de fase (Nikon Eclipse E200, ampliação 1000x), e classificados como: vesícula germinativa (VG), quebra da vesícula germinativa (VGBD), metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e metáfase II (MII). Ovócitos com cromatina difusa ou indefinida ou com aberrações cromossômicas foram considerados anormais.

#### 4.6 Fecundação *in vitro* e cultivo

Para a fecundação *in vitro* foi utilizado sêmen de um único touro, previamente testado para fertilidade. O sêmen foi descongelado a 36 °C por 30s em banho-maria e os espermatozoides foram selecionadas por centrifugação em gradiente *Percoll* [400 µl de 90% *Percoll* e 400 µl de 45% *Percoll*] (GE, Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) a 5000 × g durante 5 min) (Machado et al., 2009). O *pellet* resultante foi ressuscitado em meio de fecundação (FEC), e adicionado à gota de fecundação na concentração final de 1 x 10<sup>6</sup> espermatozoides / mL. O meio FEC consistia em Tyrode piruvato de lactato de albumina suplementado com penicilamina (2 mM), hipotaurina (1 mM), epinefrina (250 mM) e heparina (10 mg / mL) (Parrish et al., 1995).

Após a incubação dos espermatozoides com os ovócitos maturados por 12 h, os presumíveis zigotos foram parcialmente desnudados por sucessivas pipetagens, lavados em 150 µL de meio de fluido de oviduto sintético (SOF) contendo aminoácidos, citrato e inositol (Holm et al., 1999), e 5% de SFB e incubados a 38,8 °C numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Os embriões foram avaliados no dia 2 (D2) para clivagem e no D7 para taxa de blastocisto. Os embriões no D7 foram classificados de acordo com o manual da International Embryo Technology Society (IETS) (Robertson & Nelson, 1998).

#### 4.7 Produção *in vivo* de embriões pela TIFOI

Para produção de embriões *in vivo* após TIFOI, ovuladoras Nelore foram selecionadas com base no diâmetro folicular e vascularização do folículo. Os CCOs foram injetados conforme descrito anteriormente. Imediatamente após as injeções, as ovuladoras foram submetidos à IA, onde os espermatozoides foram depositados no corno uterino ipsilateral ao folículo dominante. Uma única dose de sêmen congelado de um único touro foi usada para IA após TIFOI.

Oito dias após a TIFOI, as ovuladoras foram submetidas a lavagem uterina (Sprícigo et al., 2016) para coleta de embriões. Os embriões recuperados foram avaliados em estereomicroscópio e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento. O número de estruturas totais recuperadas foi registrado, e a recuperação verdadeira foi considerada como sendo o número total de estruturas recuperadas excluindo-se uma estrutura/embrião que foi

considerado como sendo da própria vaca ovuladora (nativo). Foram classificados como ovócitos não fecundados, clivados, que incluíam aqueles degenerados com 2 ou mais células, mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx).

#### **4.8 Número total de células e porcentagem de células apoptóticas**

Para determinar o número total de células e a porcentagem de células apoptóticas, os embriões em estágio de Bx no dia sete do desenvolvimento (D7), produzidos após a maturação *in vitro* ou *in vivo*, foram corados com o Kit Termofixador Alexa Fluor da Click-iT Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) (Waltham, MA, EUA). Os embriões foram lavados em PBS suplementado com polivinilpirrolidona (PVP) (1 mg / mL) e então fixados em paraformaldeído a 3,7% por 15 min. Após lavagem com PVP, os blastocistos foram incubados em Triton-X a 0,5% durante 20 min. Finalmente, os embriões foram corados com a mistura enzimática TUNEL e Alexa Fluor 488 por 1 h a 37 °C, e depois com H33342 por 10 min. Os embriões foram então lavados com PVP, montados em lâminas e observados sob um microscópio de fluorescência, utilizando filtros de comprimento de onda de excitação 495/519 nm para Alexa Fluor 488 e excitação de 350/461 nm para H33342. Para cada blastocisto, determinou-se o número total de células individuais (núcleos azuis, H33342) e o número total de células apoptóticas (núcleos verdes, TUNEL).

#### **4.9 Delineamento Experimental**

##### **Experimento 1: Efeito do sistema de maturação *in vivo* usando TIFOI na cinética nuclear e produção de embriões**

##### **4.9.1 Cinética nuclear de ovócitos bovinos submetidos a diferentes tempos de maturação *in vivo* ou *in vitro***

O objetivo deste experimento foi avaliar se os ovócitos submetidos à TIFOI teriam a mesma cinética de maturação nuclear quando comparados com os ovócitos maturados *in vitro*. Para a maturação *in vivo*, os ovócitos imaturos aspirados de ovários de frigorífico foram injetados em folículos pré-ovulatórios (TIFOI) e mantidos no folículo durante 8 (TIFOI 8), 12 (TIFOI 12) e 16 h (TIFOI 16). Para a MIV, parte dos ovócitos

aspirados foram maturados *in vitro* por 0 (IMA), 8 (MIV8), 12 (MIV12) e 16 h (MIV16). Em cada momento os ovócitos dos diferentes grupos foram desnudados, fixados, corados e avaliados quanto ao seu estágio de maturação. Um total de 529 ovócitos foram avaliados. Em cada réplica, pelo menos um animal de cada tratamento foi utilizado para OPU.

#### **4.9.2 Desenvolvimento e qualidade de embriões produzidos após maturação ovocitária *in vivo* e / ou *in vitro***

Para avaliar se o tempo de permanência dos ovócitos dentro do folículo após a TIFOI era suficiente para esses maturarem, serem fecundados e se desenvolverem em embriões, os ovócitos foram fecundados em diferentes momentos após a TIFOI. Após 12 h dentro do folículo pré-ovulatório, os CCOs foram recuperados por OPU e distribuídos em três grupos de acordo com o momento da fecundação *in vitro*: TIFOI-12: ovócito submetido à FIV imediatamente após a OPU; TIFOI-16: os ovócitos foram maturados *in vitro* por 4 h adicionais após a OPU antes de serem fecundados; TIFOI-22: os ovócitos foram maturados *in vitro* por mais 10 h após a OPU antes de serem fecundados. O tempo de 12 h dentro do folículo até a OPU foi determinando baseando-se no primeiro experimento, onde o tempo máximo de permanência dos ovócitos dentro do folículo foi de 12 h, sendo que 16 h após a TIFOI, a maioria das vacas já havia ovulado. Além disso, às 12 h a maioria dos ovócitos submetidos à TIFOI apresentaram o estágio de maturação esperado. Para os grupos controle, os ovócitos imaturos foram maturados *in vitro* por 12 (MIV12), 16 (MIV16) e 22 h (MIV22) antes da FIV. Após a fecundação, os presumíveis zigotos de todos os grupos foram transferidos para o cultivo *in vitro* (CIV). A clivagem foi avaliada às 48 h e o desenvolvimento do blastocisto às 168 h após a FIV. Nesse momento os embriões que se encontravam no estágio de blastocisto expandido (Bx) foram utilizados para a avaliação da qualidade pela determinação do número total e porcentagem de células apoptóticas pelo método TUNEL. Um total de 158 embriões foram avaliados.

#### **Experimento 2: Determinação do número de CCOs a serem usados para TIFOI**

O objetivo deste experimento foi estabelecer o número ideal de CCOs a serem injetados no folículo dominante, para garantir a maior recuperação dos embriões.

Os CCOs foram aspirados de ovários dos abatedouros e foram distribuídos em três grupos: 1) TIFOI-10: 10 CCOs foram injetados; 2) TIFOI-25: 25 CCOs foram injetados e 3) TIFOI-50: 50 CCOs foram injetados. Um grupo de ovócitos foi destinado para PIV, para o grupo Controle.

Para avaliar o efeito do número de CCOs injetados na taxa de ovulação e formação de corpo lúteo (CL), a vascularização e o diâmetro do folículo foram medidos no momento da TIFOI, e o do CL no momento da lavagem uterina. No D7, os embriões produzidos *in vitro* (Controle) e os coletados das vacas submetidas a TIFOI foram avaliados morfológicamente quanto ao estágio de desenvolvimento.

#### **4.10 Análise estatística**

Os dados referentes ao estágio maturacional, foram comparados pelo teste exato de Fisher. As variáveis discretas (taxas de clivagem e de blastocisto, e recuperação embrionária) foram comparados pelo teste do qui-quadrado. As variáveis contínuas (parâmetros foliculares e do corpo lúteo, células totais e porcentagem de células apoptóticas), foram comparados pela ANOVA, utilizando-se o Proc Glimmix do SAS, e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito do sistema de maturação *in vivo* usando TIFOI na cinética nuclear e produção de embriões

#### 5.1.1 Efeito do sistema de maturação *in vivo* usando TIFOI na cinética nuclear

Quando os CCOs imaturos (IMA) foram avaliados, foi observado que a maioria estava no estágio VG ( $P < 0,05$ ). Após 8 h de maturação, a maioria dos ovócitos maturados *in vitro* (MIV8) e os do grupo TIFOI8, estavam no estágio MI. No entanto, o grupo TIFOI8 apresentou maior porcentagem de ovócitos em MI do que o MIV8 ( $P < 0,05$ ). Às 12 h de maturação, a maioria dos ovócitos estava no estágio MI, tanto no grupo MIV12 quanto no grupo TIFOI12. No grupo TIFOI16, a maioria dos animais tinha ovulado no momento da aspiração e, assim, um pequeno número de ovócitos foi recuperado (7), não sendo considerado para realização da análise estatística (Tabela 1).

**Tabela 1.** Estágio meiótico de ovócitos imaturos (IMA), maturados *in vitro* por 8, 12 e 16 h (MIV8, MIV12 ou MIV16) ou maturados *in vivo* após transferência intrafolicular por 8, 12 e 16 h (TIFOI8, TIFOI12 ou TIFOI16).

Tratamentos	Ovócitos N	Estágio da meiose										Anormais			
		VG		VGBD		MI		AI		TI		MII		N	(%)
		N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)		
IMA	72	69	(95,8) <sup>a</sup>	3	(4,2) <sup>ab</sup>	0	(0,0) <sup>c</sup>	0	(0,0) <sup>b</sup>	0	(0,0) <sup>c</sup>	0	(0,0) <sup>b</sup>	0	(0,0) <sup>b</sup>
MIV8	85	12	(14,1) <sup>b</sup>	5	(5,9) <sup>a</sup>	59	(69,4) <sup>c</sup>	0	(0,0) <sup>b</sup>	0	(0,0) <sup>c</sup>	2	(2,4) <sup>b</sup>	7	(8,2) <sup>a</sup>
MIV12	83	0	(0,0) <sup>c</sup>	2	(2,4) <sup>ab</sup>	70	(84,3) <sup>b</sup>	0	(0,0) <sup>b</sup>	8	(9,6) <sup>b</sup>	1	(1,7) <sup>b</sup>	2	(2,4) <sup>b</sup>
MIV16	94	0	(0,0) <sup>c</sup>	0	(0,0) <sup>b</sup>	31	(33,0) <sup>d</sup>	11	(11,7) <sup>a</sup>	42	(44,7) <sup>a</sup>	9	(9,6) <sup>a</sup>	1	(1,1) <sup>b</sup>
TIFOI8	98	1	(1,0) <sup>c</sup>	0	(0,0) <sup>b</sup>	96	(98,0) <sup>d</sup>	0	(0,0) <sup>b</sup>	1	(1,0) <sup>c</sup>	0	(0,0) <sup>b</sup>	0	(0,0) <sup>b</sup>
TIFOI12	97	5	(5,2) <sup>c</sup>	2	(2,1) <sup>ab</sup>	72	(74,2) <sup>c</sup>	4	(4,1) <sup>b</sup>	7	(7,2) <sup>b</sup>	0	(0,0) <sup>b</sup>	7	(7,2) <sup>a</sup>
Valor de P		<0,0001		0,0315		<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	

<sup>a, b, c, d, e</sup> Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste exato de fisher (P <0,05). VG = vesícula germinativa; VGBD = quebra da vesícula germinativa; MI = metáfase I; AI = anáfase I; TI = telófase I; MII = metáfase II. \*Apenas 7 ovócitos foram recuperados neste tratamento, uma vez que a maioria das ovuladoras já havia ovulado.



### 5.1.2 Desenvolvimento e qualidade de embriões produzidos após a maturação ovocitária *in vivo* e / ou *in vitro*

A comparação entre os grupos mostrou que a maior taxa de clivagem ( $P < 0,05$ ) foi observada em ovócitos que maturaram *in vitro* por 22 h (MIV22). Quando somente os ovócitos dos grupos submetidos à TIFOI foram avaliados, foi observado que a taxa de clivagem foi semelhante para TIFOI12, TIFOI16 e TIFOI22 ( $P > 0,05$ ).

A taxa de blastocistos no D7 foi semelhante ( $P > 0,05$ ) dentro de cada grupo, mas a taxa foi maior nos grupos MIV em comparação com os grupos TIFOI ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Desenvolvimento embrionário de ovócitos maturados *in vitro* (MIV) por 12, 16 ou 22 h (MIV12, MIV16 e MIV22), ou maturados *in vivo* após transferência intrafolicular por 12 h (TIFOI12), maturados *in vivo* por 12 h com 4 adicionais (TIFOI16) ou 10 h adicionais de MIV (TIFOI22).

Tratamentos	Ovócitos	Clivagem D2		Blastocistos D7	
	N	N	(%)	N	(%)
MIV12	223	187	(83,9) <sup>a,c</sup>	79	(35,4) <sup>a</sup>
MIV16	229	186	(81,2) <sup>a,d</sup>	84	(36,7) <sup>a</sup>
MIV22	236	208	(88,1) <sup>c</sup>	96	(40,7) <sup>a</sup>
TIFOI12h	239	185	(77,4) <sup>a,b</sup>	45	(18,8) <sup>b</sup>
TIFOI16h	185	130	(70,3) <sup>b</sup>	32	(17,3) <sup>b</sup>
TIFOI22h	185	141	(76,2) <sup>b,d</sup>	40	(21,6) <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Letras diferentes indicam diferenças na mesma coluna pelo teste do qui-quadrado ( $P < 0,05$ ).

Os blastocistos expandidos foram analisados em D7 para o número total de células e células apoptóticas. Os resultados são apresentados na Tabela 3. Não foram observadas diferenças no número total de células entre os grupos ( $P > 0,05$ ). No entanto, a porcentagem de células apoptóticas no grupo TIFOI22 foi menor, em comparação com os grupos MIV em todos os momentos ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Número total de células e porcentagem de células apoptóticas de blastocistos expandidos obtidos de ovócitos maturados *in vitro* (MIV) por 12, 16 ou 22 h (MIV12, MIV16 e MIV22) ou maturados *in vivo* por 12 h (TIFOI12), ou maturados *in vivo* durante 12 h com 4 adicionais (TIFOI16) ou 10 h (TIFOI22) de MIV.

Tratamentos	Bx	Total de células	Células apoptóticas
	N	média ±D.P.	%
MIV12	32	143,2 ±37,7	7,2% <sup>a</sup>
MIV16	29	151,1 ±38,3	7,1% <sup>a</sup>
MIV22	40	158,6 ±36,2	6,3% <sup>ab</sup>
TIFOI12	17	143,8 ±35,8	5,1% <sup>ab</sup>
TIFOI16	17	132,5 ±30,0	6,3% <sup>ab</sup>
TIFOI22	23	131,9 ±34,4	4,1% <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam diferenças na mesma coluna após o teste ANOVA e médias comparadas por Tukey (P <0,05). N = número de blastocistos expandidos avaliados; D.P. = desvio padrão.

### 5.2 Determinação do número de CCOs a serem usados para TIFOI

Como mostrado na Tabela 4, a quantidade de CCOs injetados durante a TIFOI não teve efeito sobre a taxa de ovulação nos diferentes tratamentos (P > 0,05). O diâmetro e a vascularização do folículo no momento da injeção e o diâmetro e a vascularização do CL foram semelhantes entre os tratamentos (P > 0,05). Em relação ao número de estruturas, não foram observadas diferenças na taxa de embriões recuperados após a TIFOI e na taxa de recuperação total de estruturas (P > 0,05) entre os grupos (Tabela 5). No entanto, quando a taxa de recuperação verdadeira foi comparada, ou seja, removendo o ovócito nativo da vaca ovuladora, notou-se que a injeção de 50 CCOs no folículo dominante resultou no maior percentual de recuperação de estruturas (P < 0,05). Além disso, quando as taxas de recuperação embrionária (total e verdadeira) foram comparadas, não houve diferença entre os tratamentos (P < 0,05). Após a PIV, um total de 73 blastocistos foi produzido a partir de 180 ovócitos (40,5%), e este percentual foi significativamente maior (P < 0,05) em comparação com todos os tratamentos TIFOI.

**Tabela 4.** Diâmetro e irrigação (média  $\pm$  D.P.) do folículo antes da transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) e do corpo lúteo (CL) 8 dias após a TIFOI. A taxa de ovulação é representada pela porcentagem (%) de vacas usadas para a TIFOI e que ovularam.

Tratamento	Injeções	Ovócitos injetados	Folículo		Ovulações	Corpo Lúteo	
			Diâmetro (mm)	Escala de Irrigação (1-5)		Diâmetro (mm)	Escala de Irrigação (1-5)
			Média $\pm$ D.P.	Média $\pm$ D.P.		Média $\pm$ D.P.	Média $\pm$ D.P.
	N	N			N (%)		
TIFOI 10	11	110	12,5 $\pm$ 1,0	1,5 $\pm$ 0,7	8 (72,7%)	17,0 $\pm$ 2,7	4,0 $\pm$ 0,5
TIFOI 25	14	350	12,7 $\pm$ 1,5	1,6 $\pm$ 0,5	11 (78,6%)	19,3 $\pm$ 3,1	3,9 $\pm$ 0,5
TIFOI 50	15	750	12,9 $\pm$ 2,0	1,9 $\pm$ 0,4	12 (80,0%)	18,4 $\pm$ 2,8	3,7 $\pm$ 0,8
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>1210</b>	<b>12,7 <math>\pm</math>1,6</b>	<b>1,7 <math>\pm</math>0,5</b>	<b>31 (77,5%)</b>	<b>18,2 <math>\pm</math>2,9</b>	<b>3,9 <math>\pm</math>0,6</b>

Os dados do folículo e do corpo lúteo foram analisados pela ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As taxas de ovulação foram analisadas pelo teste do qui-quadrado ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 5.** Número (N) de ovócitos injetados e número (N) e porcentagem (%) de estruturas e embriões recuperados no dia 8 (D8) quando o ovócito nativo foi incluso (Recuperação Total) ou excluído (Recuperação Verdadeira). A taxa de fecundação, representada pelo número (N) e porcentagem (%) de estruturas degeneradas e embriões recuperados, em função do número de ovócitos injetados, em cada tratamento (10, 25 ou 50 ovócitos).

Tratamento	Animais	Ovócitos injetados	Recuperação total no D8				Recuperação verdadeira no D8				Fecundados no D8 *	
			Estruturas		Embriões		Estruturas		Embriões		N	%
			N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)		
TIFOI 10	8	80	29	(36,3%)	7	(8,8%)	21	(26,3%) <sup>b</sup>	3	(3,8%)	24	(82,8%)
TIFOI 25	11	275	87	(31,6%)	25	(9,1%)	78	(28,4%) <sup>b</sup>	21	(7,6%)	57	(65,5%)
TIFOI 50	12	600	258	(43,0%)	36	(6,0%)	246	(41,0%) <sup>a</sup>	28	(4,7%)	178	(69,0%)
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>955</b>	<b>374</b>	<b>(39,2%)</b>	<b>68</b>	<b>(7,1%)</b>	<b>345</b>	<b>(36,1%)</b>	<b>52</b>	<b>(5,4%)</b>	<b>259</b>	<b>(69,3%)</b>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), os dados foram analisados pelo teste do qui-quadrado. TIFOI= transferência intrafolicular de ovócitos imaturos.

## 6 DISCUSSÃO

A técnica TIFOI pode ser uma alternativa para eliminar alguns dos problemas associados aos sistemas *in vitro*, uma vez que permite que os CCOs obtidos de doadoras possam ser maturados, fecundados e cultivados *in vivo*. Porém, sua eficiência ainda é baixa e, para que se possa melhorar essa eficiência, é necessário identificar os problemas relacionados à técnica e tentar solucioná-los. Devido aos poucos estudos realizados utilizando a TIFOI para produção de embriões, muitas questões básicas precisam ser respondidas e portanto, este estudo teve como foco elucidar algumas dessas questões.

Um dos problemas da técnica a ser resolvido (Bergfelt et al., 1998; Kassens et al., 2015; Sprícigo et al., 2016) é o tempo que os ovócitos devem ser mantidos dentro do folículo pré-ovulatório. Isso porque os CCOs devem permanecer tempo suficiente antes da ovulação para que a maturação ocorra por completa, mas esse tempo não pode ser demasiado longo para que não haja o envelhecimento dos ovócitos. Para avaliar isso, CCOs foram injetados em folículos dominantes de vacas ovuladoras previamente sincronizadas e foram aspirados em diferentes momentos. Com base no protocolo de sincronização utilizado, foi estimado que o momento da injeção, 52 h após a remoção da progesterona, corresponderia a 10-12 h após o pico de LH e, portanto, os CCOs permaneceriam por 16-20 h dentro do folículo. No entanto, quando a OPU para recuperação dos ovócitos foi realizada 16 h após as injeções (TIFOI 16) apenas 7 ovócitos foram recuperados de apenas uma vaca, pois a maioria delas (89%) já havia ovulado.

Em relação aos ovócitos mantidos por 8 e 12 h no interior do folículo (TIFOI 8 e TIFOI 12), observou-se que a maioria dos ovócitos se encontrava no estágio de MI, semelhante ao observado para os ovócitos maturados *in vitro* às 8 e 12 h (MIV8 e MIV12). Além disso, os ovócitos TIFOI 8 estavam mais agrupados em determinado estágio de maturação, em comparação aos ovócitos MIV8. Estes resultados sugerem que a maturação nuclear não é um problema a ser considerado, pois foi semelhante à dos ovócitos maturados *in vitro*. No entanto, considerando que a maioria das vacas tinha ovulado 16 h após a TIFOI e que às 12 h, cerca de 70% dos ovócitos estavam no estágio de MI, assumiu-se que o tempo

que os CCOs permaneceram no folículo não foi suficiente para completar a maturação, o que poderia afetar a fecundação e o desenvolvimento embrionário subsequente. Então, para avaliar se os CCOs precisariam de mais tempo para maturação, realizou-se a OPU 12 h depois da TIFOI. Alguns dos ovócitos foram imediatamente fecundados *in vitro* e os outros foram transferidos para o cultivo por mais 4 (TIFOI 16) ou 10 h (TIFOI 22) antes da FIV. O tempo de 4 h foi escolhido porque a ovulação provavelmente teria ocorrido por volta de 16 h após a TIFOI. Para o grupo de ovócitos com 10 h adicionais de MIV, o objetivo era completar as 22 h normalmente utilizada nos sistemas *in vitro* (Luciano et al., 2009). Os resultados sugeriram que 12 h de maturação *in vivo* dentro do folículo não era um fator limitante para o ovócito ser fecundado e se desenvolver em embrião. Não só a clivagem, mas também as taxas de blastocistos foram semelhantes entre os grupos TIFOI. As taxas de blastocisto indicaram que os ovócitos tinham a mesma capacidade de desenvolvimento do que os ovócitos que foram maturados por 16 ou 22 h. Portanto, eles não precisariam de mais tempo para completar a maturação, serem fecundados e se desenvolverem até embrião. Independente do tempo, a produção de embriões através da TIFOI foi menor, em comparação com os ovócitos maturados *in vitro*. No entanto, é importante ressaltar que os ovócitos submetidos à TIFOI foram expostos a diversos procedimentos estressantes, como o processo de injeção intrafolicular, a OPU, a lavagem no filtro e o rastreamento. É possível que o estresse induzido por esses processos possa ter afetado seu desenvolvimento embrionário após a fecundação (Rensis & Scaramuzzi, 2003).

Como grande parte do tempo de maturação foi realizado *in vivo* no grupo TIFOI, verificou-se se os embriões oriundos desses ovócitos teriam melhor qualidade. O ensaio TUNEL revelou que o número de células foi semelhante entre todos os grupos tratados. No entanto, a porcentagem de células apoptóticas no grupo TIFOI 22 foi menor do que nos outros grupos TIFOI, e foi semelhante ao MIV22. Embora era esperado que embriões produzidos por TIFOI seriam de melhor qualidade do que os produzidos após a MIV, os resultados sugeriram que os blastocistos expandidos derivados dos grupos TIFOI e MIV apresentaram as mesmas características morfológicas. No entanto, vale ressaltar que apenas o número de células e o percentual de células apoptóticas foram utilizados para avaliar a qualidade do embrião; sendo que se outras variáveis, como por exemplo, a taxa de prenhez, tivessem sido avaliadas é possível que o resultado fosse diferente.

O efeito do número de CCOs injetados durante a TIFOI na taxa de ovulação e número de estruturas recuperadas também foi avaliado. Observou-se que o número de CCOs utilizados para TIFOI não afetou a ovulação, o diâmetro do CL e a vascularização. Além

disso, os resultados também demonstraram que a TIFOI utilizando uma faixa de 10 a 50 CCOs por injeção mostrou taxas semelhantes de recuperação embrionária, oito dias após a injeção e IA. No entanto, quando 50 CCOs foram usados, a taxa de recuperação de estruturas (ovócito-embrião) foi maior que nos outros grupos. A taxa de recuperação total foi semelhante à observada por Kassens et al. (2015), que utilizaram 60 ovócitos maturados *in vitro* para injeção, Hoelker et al. (2017) que usaram 50 ovócitos e foi maior à observada por Andrlíkova et al. (2020), utilizando 50 ovócitos. No entanto, a razão pela qual a maior taxa de recuperação total com 50 ovócitos foi obtida, em comparação com 10 ou 25 ovócitos, é desconhecida. Embora 69,3% das estruturas recuperadas tenham sido fecundadas, elas não continuaram seu desenvolvimento até o estágio do blastocisto. Os fatores responsáveis pela baixa taxa de desenvolvimento e recuperação ainda são desconhecidos, sugerindo que mais estudos precisam ser realizados para esclarecer esses fatores.

## **7 CONCLUSÕES**

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a maturação de ovócitos realizada no folículo após a TIFOI é semelhante à MIV e que o tempo em que os ovócitos permanecem dentro do folículo da vaca ovuladora não é um fator limitante para sua fecundação e seu desenvolvimento em embriões. Além disso, o número de ovócitos injetados nos folículos não afetou a taxa de recuperação, a taxa de fecundação e a taxa de produção de embriões. Mais estudos devem ser realizados para identificar outros fatores que possam interferir na eficiência da TIFOI, como o momento em que os ovócitos são injetados no folículo, se isso afeta o tempo de permanência no folículo e conseqüentemente a ovulação e qualidade dos embriões recuperados após a coleta.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRLIKOVA, M.; BINA, V.; KOS, V.; LOPATAROVA, M.; MARKOVA, B.; STENCLOVA, L.; CECH, S. Intrafollicular oocyte transfer in cattle – a technical report. **Acta Veterinaria Brno**. V. 89, p. 11-17, 2020.

BERGFELT, D.R.; BROGLIATTI, G.M.; ADAMS, G.P. Gamete recovery and follicular transfer (graft) using transvaginal ultrasonography in cattle. **Theriogenology**, v.50, p.15-25, 1998.

HANSEN, P. J. Implications of assisted reproductive technologies for pregnancy outcomes in mammals. **Annual Review Animal Biosciences**. V. 8, n. 1, 2020.

HOELKER, M.; KASSENS. A.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI, C.; TEFAYE, D.; NEUHOFF, C.; SCHELLANDER, K.; HELD- HOELKER, E. Birth of healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 15; n. 97, p. 41-49, 2017.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52, p. 683-700, 1999.

KASSENS, A.; HELD, E.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI, C.; TEFAYE, 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, 2015.

LUCIANO, A. M.; CHIGIONI, S.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; LUVONI, G. C.; MODINA, S. C. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. **Cryobiology**, v. 59, p. 90-95, 2009.

MACHADO, G.M; CARVALHO, J.O; FILHO, E. S; CAIXETA, E.S; FRANCO, M.M; RUMPF, R.; DODE, M.A. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n.8, p. 1289-1297, 2009.

MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: practical use for reproductive management in the cow. **The Veterinary Journal**, v.181, p. 232-40, 2009.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995.

RENSIS, F.D.; SCARAMUZZI, J.R. Heat Stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. **Theriogenology**, v.6, p.1139-1151, 2003

ROBERTSON, I.; NELSON, R.E. Certification and identification of the embryo. In: Stringfellow D, Seidel SM (Ed.). **Manual of the International Embryo Transfer Society**. IETS, Savoy, IL, USA. P.103-134, 1998.

SARTORI, R.; PRATA, A. B.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SANCHES, B. V.; PONTES, G. C. S.; VIANA, J. H. M.; PONTES, J. H.; VASCONCELOS, J. L. M.; PEREIRA, M. H. C.; DODE, M. A. N.; MONTEIRO JR, P. L. J.; BARUSELLI, P. S. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Anim Reprod**, v. 13, p. 300-312, 2016.

SENA-NETTO, S. B.; SPRÍCIGO, J.F.W.; LEME, L.O.; GUIMARÃES, A.L.S.; CAIXETA, F.M.C.; DODE, M.A.N.; PIVATO, I. The Replacement of Fetal Bovine Serum with Bovine Serum Albumin During Oocyte Maturation and Embryo Culture Does Not Improve Blastocyst Quality After Slow Freezing Cryopreservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 18, p. 171-179, 2020.

SPRÍCIGO, J. F. W.; SENA NETTO, S. B.; MUTERLLE, C. V.; RODRIGUES, S. A. D.; LEME, L. O.; GUIMARÃES, A. S.; CAIXETA, F.M.; FRANCO, M.M.; PIVATO, I. DODE, M.A. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 86, p. 2054–2062, 2016.

SUDANO, M. J.; CAIXETA, E. S.; PASCHOAL, D. M.; MARTINS JR, A.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; et al. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivoproduced blastocysts. **Reprod Fertil Dev**, v. 26, p. 1129–1141, 2014.

VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO, A.C.S.; SIQUEIRA, L.G.B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v.14, p.476-481, 2017

WRENZYCKI, C. In vitro culture systems: how far are we from optimal conditions? **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 279-282, 2016.

### **CAPÍTULO 3**

#### **EFEITO DO MOMENTO DA TRANSFERÊNCIA INTRAFOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS (TIFOI) NA QUALIDADE E RECUPERAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Luzia Renata Oliveira Dias<sup>1</sup>; Otávio Augusto Costa de Faria<sup>2</sup>; Leticia Prates<sup>2</sup>; Rodrigo Moura<sup>2</sup>; Ivo Pivato<sup>1</sup>; Margot Alves Nunes Dode<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, Distrito Federal, Brasil

<sup>2</sup> Universidade de Brasília, Instituto de Biologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil

<sup>3</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Reprodução Animal, Brasília, Distrito Federal, Brasil

**BRASÍLIA/DF**  
**MARÇO DE 2021**

## 1 RESUMO

Com o objetivo de aumentar a taxa de recuperação embrionária após a transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI), dois experimentos foram realizados. Inicialmente, foi avaliado se o tempo que os ovócitos permanecem no folículo após a injeção afetaria a recuperação embrionária. Ovócitos obtidos de ovários de abatedouro foram utilizados para a produção *in vitro* de embriões (Controle), ou foram injetados no folículo pré-ovulatório de vacas ovuladoras (TIFOI) (25 ovócitos por ovuladoras) em diferentes momentos: 24 (TIFOI 24), 36 (TIFOI 36) ou 52 (TIFOI 52) h após a remoção do implante de progesterona (P4). Ovuladoras de todos os grupos foram inseminadas artificialmente (IA) e receberam indução da ovulação 52 h após a remoção de P4. Oito dias após a IA os animais foram submetidos a lavagem uterina para coleta dos embriões. Os embriões recuperados no estágio de blastocistos expandidos (Bx) foram avaliados quanto à qualidade por coloração diferencial das células da massa celular interna e trofoblasto. O grupo TIFOI 36 apresentou maior ( $P<0,05$ ) taxa de recuperação embrionária (5,8%) que o grupo TIFOI 24 (1,7%), mas foi semelhante ao grupo TIFOI 52 (3,9%). Já a taxa de recuperação de estruturas foi maior ( $P<0,05$ ) no grupo TIFOI 36 (41,4%) que os demais, TIFOI 24 (29,6%) e TIFOI 52 (22,7%). A qualidade embrionária não diferiu entre os tratamentos. No segundo experimento, o objetivo foi comparar se o momento da indução da ovulação afetaria a taxa de recuperação embrionária. Para isso, os ovócitos imaturos foram injetados no folículo dominante de vacas previamente sincronizadas: (1) 36 h após a remoção do implante de P4 e indução da ovulação 52 h após a remoção (TIFOI 36) ou (2) 36 h após a remoção do implante de P4 e indução da ovulação 40 h após a remoção de P4 (TIFOI 36+). Oito dias após, foi realizada a coleta de embriões por lavagem uterina e os Bx foram avaliados quanto a qualidade embrionária. O tratamento TIFOI 36 apresentou maior ( $P<0,05$ ) taxa de recuperação embrionária e de estruturas (4,4% e 23,4%) com relação ao TIFOI 36+ (1,1% e 10,7%), mas a qualidade embrionária não diferiu entre eles e o grupo Controle. Em conclusão, o tempo que os ovócitos permanecem no folículo após a injeção afeta a taxa de recuperação embrionária e de estruturas, mas não a qualidade dos

embriões. Além disso, o momento da indução da ovulação afetou a taxa de recuperação embrionária.

**Palavras-chave:** embriões bovinos; qualidade embrionária; injeção intrafolicular; produção *in vitro* de embriões; produção *in vivo* de embriões

## 2 ABSTRACT

Aiming to increase the rate of embryonic recovery after intrafollicular transfer of immature oocytes (IFIOT), two experiments were performed. First, we evaluated if the time that oocytes remain in the follicle after injection would affect embryo recovery. Immature oocytes obtained from slaughterhouse ovaries were used for in vitro embryo production (Control), or were injected into the preovulatory follicle of ovulatory cows (25 oocytes per ovulator) at different times: 24 (IFIOT 24), 36 (IFIOT 36) or 52 (IFIOT 52) h after removal of the progesterone implant (P4). The ovulators underwent artificial insemination (AI) and received ovulation induction 52 h after P4 removal. Eight days after IFIOT, the uteri of the ovulators were flushed to recover embryos. Embryos recovered at the expanded blastocyst (Bx) stage were evaluated for quality by differential staining of cells of the internal cell mass and trophoblast. The IFIOT 36 group presented a higher ( $P < 0.05$ ) embryonic recovery rate (5.8%) than the IFIOT 24 group (1.7%), but it was similar to the IFIOT 52 group (3.9%). The recovery rate of ova was higher ( $P < 0.05$ ) in the IFIOT 36 (41.4%) group than the others, IFIOT 24 (29.6%) and IFIOT 52 (22.7%). Embryonic quality was similar ( $P > 0.05$ ) among treatments. In the second experiment, the aim was to compare whether the timing of ovulation induction would affect the recovery rate of embryos. For this, immature oocytes were injected into the dominant follicle of previously synchronized cows: (1) 36 h after removal of the P4 implant and induction of ovulation 52 h after removal (IFIOT 36); (2) 36 h after P4 implant removal and ovulation induction 40 h after P4 removal (IFIOT 36+). Eight days after IFIOT, the uteri of the ovulators were flushed to recover embryos and the Bx were provided for the evaluation of embryonic quality. The IFIOT 36 treatment showed a higher rate ( $P < 0.05$ ) of embryo and structure recovery (4.4% and 23.4%) compared to IFIOT 36+ (1.1% and 10.7%), but embryonic quality was similar ( $P > 0.05$ ) among treatments and the Control group. In conclusion, the time that the oocytes remain in the follicle after injection affects the embryonic and structure recovery rate, but not the quality of the embryos. In addition, the timing of ovulation induction affected the rate of embryonic recovery.

**Keywords:** bovine embryos; embryonic quality; intrafollicular injection; in vitro embryo production; in vivo embryo production

### 3 INTRODUÇÃO

A busca por embriões bovinos de melhor qualidade e que após sua transferência para receptoras, resultem em prenhez tem sido o foco de vários estudos (Kassens et al., 2015; Takahashi et al., 2016; Zullo et al., 2016, Hoelker et al., 2017; Demetrio et al., 2020). As técnicas de reprodução assistida oferecem alternativas para produção de embriões bovinos, podendo ser a produção *in vitro* (PIV) de embriões e a produção *in vivo*, pela superestimulação ovariana (SOV) ou pela transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI). Dentre as opções, a mais utilizada atualmente é a PIV, já estabelecida e que mantém suas taxas de produção de blastocistos (40%) e de prenhez (40%) (Sartori et al., 2016; Wrenzycki, 2016; Demetrio et al., 2020). Já a SOV foi mais utilizada anteriormente e resulta no embrião de melhor qualidade, mas com o surgimento da PIV, passou a ser menos atrativa. Mais recentemente, a TIFOI tem sido o foco de estudos que buscam o embrião mais próximo do embrião SOV e que permita o melhor aproveitamento da população folicular da fêmea bovina, assim como na PIV (Kassens et al., 2015; Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017; Andrlíkova et al., 2020).

Na TIFOI, ovócitos aspirados de vacas doadoras são injetados no folículo dominante de uma vaca ovuladora previamente sincronizada e, 8 dias após a inseminação artificial da mesma, os possíveis embriões são coletados por lavagem uterina (Sprícigo et al., 2016). No entanto, apesar de ter sido relatado o nascimento de bezerros saudáveis resultantes da técnica, a taxa de recuperação embrionária ainda é considerada baixa (Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017; Andrlíkova et al., 2020) e fatores que podem afetar o desenvolvimento da TIFOI precisam ser esclarecidos.

Entre os fatores que podem interferir na taxa de recuperação embrionária após a TIFOI está o momento em que os ovócitos são injetados no folículo pré-ovulatório das ovuladoras, visto que as condições ambientais do folículo podem ser diferentes de acordo com o momento em que o folículo é utilizado após a remoção do implante de progesterona (P4). Isto porque, trabalhos anteriores que utilizando a TIFOI utilizaram a mesma base de protocolo



hormonal considerando o tempo mínimo de permanência dos ovócitos no folículo utilizado no momento da injeção (Kassens et al., 2015; Sprícigo et al., 2016, Hoelker et al., 2017).

Além disso, ainda não se sabe se o tempo em que eles permanecem no folículo pode interferir na taxa de recuperação embrionária. Portanto, objetivou-se (1) verificar se o tempo em que os ovócitos permanecem no folículo após a injeção afetaria a taxa de recuperação embrionária, utilizando diferentes momentos para ser realizada a injeção após a remoção do implante de P4; (2) comparou-se se o momento da indução da ovulação afetaria a taxa de recuperação embrionária.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A menos que seja indicado, os produtos químicos foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA / Embrapa Recursos Genéticos Animais e Biotecnologia – Protocolo CEUA – Cenargen 006/2019).

### 4.1 Recuperação de ovócitos e maturação *in vitro*

Os ovários foram coletados em abatedouro local imediatamente após o abate e transportados para o laboratório, à temperatura de 36 ° C. No laboratório, foram lavados com solução salina (NaCl 0,9%) suplementada com penicilina G (100 IU / mL) e sulfato de estreptomicina (100 g / mL) a 36°C. Os complexos cumulus de ovócitos (CCOs) foram aspirados dos folículos (3 a 8 mm de diâmetro) com uma agulha hipodérmica (18 G) acoplada a uma seringa de 10 mL e transferidos para um tubo cônico de 15 mL. Após 10 minutos, o líquido folicular sobrenadante foi removido e centrifugado por 5 min a 700 × g. O líquido folicular foi utilizado para busca e seleção dos COCs.e apenas aqueles com citoplasma homogêneo e pelo menos três camadas de células cumulus foram usados para os experimentos. Os CCOs selecionados foram lavados em meio de maturação *in vitro* (MIV) e transferidos em grupos de 25 para 150 µL de meio de MIV ou foram usados para TIFOI. O meio MIV consistia em TCM 199 saís de Earl (Invitrogen® - Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen®), 0,01 UI / mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 0,1 mg / mL de L-glutamina, cisteamina 1 µM, piruvato de sódio 1 µM e sulfato de amicacina 0,075 mg / mL. Os CCOs foram maturados por 24 h em gotas de meio MIV cobertas com óleo mineral à 38,8°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

#### 4.2 Fecundação e cultivo *in vitro*

Para a fecundação *in vitro*, foi usado sêmen de um touro com fertilidade previamente testada em laboratório. As doses foram descongeladas à 36°C por 30s em banho-maria e as células espermáticas foram selecionadas por centrifugação em gradiente de Percoll [400 µl Percoll 90% e 400 µl Percoll 45%] (GE, Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) 5000 × g por 5 min (Machado et al., 2009). O *pellet* resultante foi ressuspensionado em meio de fecundação (FEC), e adicionado à gota de fecundação na concentração final de 1 x 10<sup>6</sup> espermatozoides / mL. O meio FEC consistia em Tyrode piruvato de lactato de albumina suplementado com penicilamina (2 mM), hipotaurina (1 mM), epinefrina (250 mM) e heparina (10 mg / mL) (Parrish et al., 1995). Espermatozoides e ovócitos foram co-incubados por 18-20 h. Os possíveis zigotos foram então, pipetados sucessivamente para remover as células do cúmulus, lavados em 150 µL de meio de fluido de oviduto sintético (SOF) e incubados a 38,8°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. O meio SOF era composto por aminoácidos essenciais e não essenciais, 0,34 mM de tricitrato de sódio, 2,77 mM DE mio-inositol e 5% de SFB (Invitrogen®ogen).

O desenvolvimento embrionário foi avaliado no D2 para clivagem e no D7 para formação de blastocisto. No D7, os embriões foram classificados de acordo com o manual da International Embryo Technology Society (IETS) (Robertson & Nelson, 1998) e aqueles no estágio de blastocisto expandido (BX) foram usados para avaliação da qualidade embrionária pela coloração diferencial de células.

#### 4.3 Sincronização do estro e transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI)

No D0 do protocolo as ovuladoras receberam um dispositivo intravaginal de P4 (Primer, Agener União Saúde animal, Tecnopec, São Paulo, São Paulo, Brasil) e uma aplicação intramuscular (im) de 2 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE, Agener União Saúde animal, Tecnopec, São Paulo, São Paulo, Brasil)]. Oito dias após, o dispositivo de progesterona P4 foi retirado e os animais receberam uma injeção de 2 mL (im) de prostaglandina F<sub>2α</sub> [0,150 mg de cloprostenol (Estron, Agener União Saúde Animal, Tecnopec, São Paulo, São Paulo, Brasil). No D9, 1 mg de benzoato de estradiol (im) foi administrado.

A TIFOI foi realizada conforme descrito anteriormente por Sprícigo et al. (2016). Resumidamente, vacas Nelore com um único folículo pré-ovulatório, maior ou igual a

9 mm de diâmetro, foram utilizadas. A injeção foi realizada com o auxílio de uma guia transvaginal (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil) contendo uma sonda de ultrassom convexa de 7,5 MHz (Aloka, Tóquio, Japão). O sistema de injeção consistia em um mandril montado em sistema fechado, com uma agulha (27G, Uniever Unisis, Tóquio, Honshu, Japão) e uma seringa de insulina na outra extremidade. Primeiro, todo o sistema de injeção foi preenchido com PBS. Os CCOs foram puxados para dentro da agulha com um volume máximo de 60  $\mu$ L de fluido folicular. Esse sistema foi incorporado em uma guia transvaginal e posicionado no fórnix vaginal do mesmo lado do ovário contendo o folículo dominante. Então a agulha foi pressionada e perfurou o fórnix e a parede folicular. Quando a agulha se tornou visível no antro folicular, o fluido folicular contendo os CCOs foi injetado no folículo. O tempo para a realização da injeção no folículo pré-ovulatório após a remoção do implante foi definido de acordo com o desenho experimental (Figura 1). Em todos os tratamentos a ovulação foi induzida pela administração (im) de 1 ml de um análogo do GnRH (Gestran, Tecnopec, São Paulo, São Paulo, Brasil) e a inseminação artificial (IA) foi feita com sêmen do mesmo touro.

#### **4.4 Coleta de embriões após TIFOI**

Oito dias após a IA, as vacas que ovularam foram avaliadas quanto ao diâmetro do corpo lúteo e foram submetidas à lavagem uterina conforme descrito anteriormente (Sprícigo et al., 2016). Os embriões recuperados foram avaliados em estereomicroscópio e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento.

O número total de estruturas recuperadas (ovócitos não fecundados, clivados, degenerados e embriões) foi avaliado. A recuperação verdadeira foi considerada como sendo o número total de estruturas recuperadas excluindo uma estrutura/embrião que foi considerado como sendo da própria vaca ovuladora. Os embriões foram classificados em estágio de mórula (Mo), mórula compacta (Mc), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx). Em seguida, os embriões no estágio Bx foram corados pela técnica de coloração diferencial, para avaliação da qualidade embrionária.

#### 4.5 Coloração diferencial de células

Apenas embriões no estágio Bx foram usados para coloração diferencial, que foi realizada conforme descrito por Block et al. (2009) com algumas modificações. Os embriões foram lavados em solução de lavagem consistindo de PBS suplementado com 0,1% de polivinilpirrolidona (PVP). Em seguida, foram incubados por 30 segundos a 36 ° C em 500 µL de gota de solução de iodeto de propídio (IP) (100 µg / mL). Posteriormente, os blastocistos foram lavados três vezes em solução de lavagem e transferidos para uma gota de solução de Hoescht 33342 (H33342) (100 µg / mL), onde permaneceram por 15 minutos. Por fim, foram montados entre a lâmina e a lamínula com solução slowfade® (ThermoFisher Scientific, São Paulo, São Paulo, Brasil). A contagem de células foi realizada em microscópio de fluorescência (Axiophot 2, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) em ampliação de 40 X sob luz ultravioleta com excitação de 560 nm (IP) para contagem do número de células do trofoectoderme (TE) e 460 nm (H33342) para contar a massa celular interna (ICM). Após a contagem, utilizou-se a média da porcentagem de ICM/células totais, sendo os que apresentavam entre 20% e 40% de ICM / células totais foram considerados os de melhor qualidade.

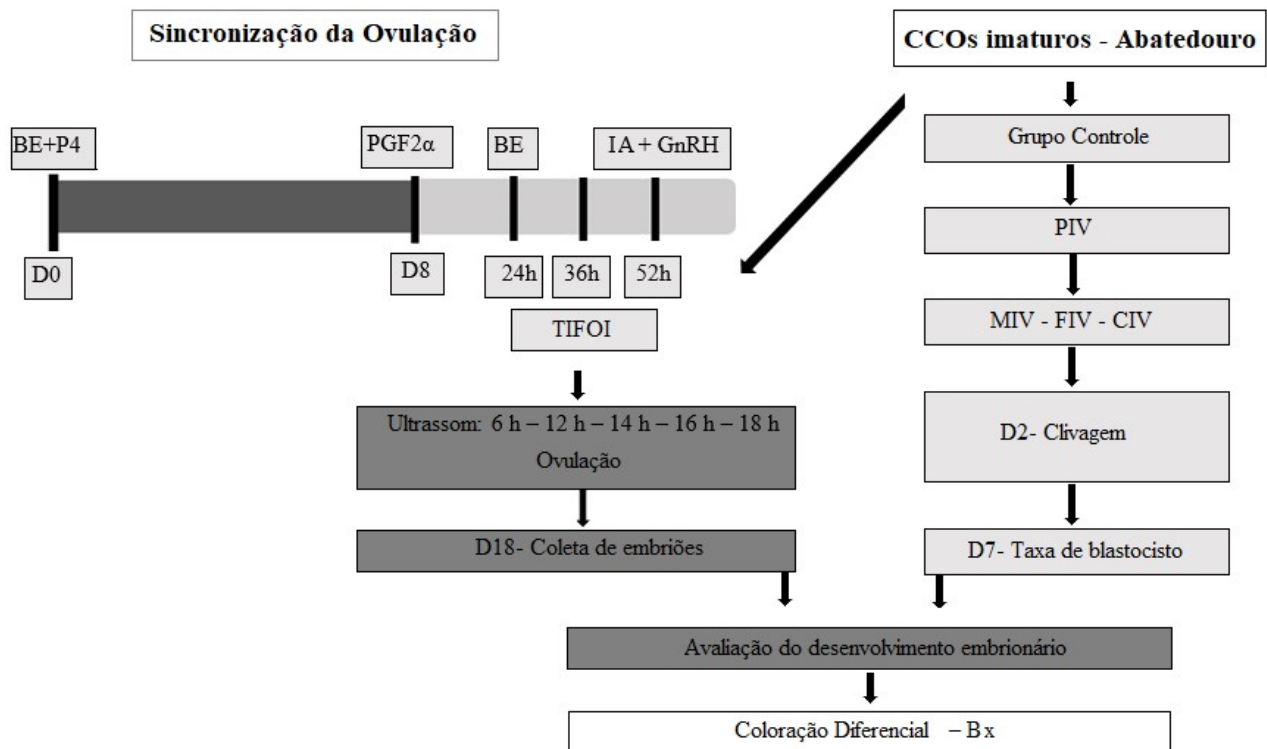
#### 4.6 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis contínuas (diâmetro folicular, intervalos até a ovulação, diâmetro folicular) foram então submetidas à ANOVA, utilizando-se o Proc Glimmix do SAS, com ajuste pelo tipo de distribuição, e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Variáveis discretas (expressas em %) foram analisadas usando o Proc Freq do SAS, e as diferenças entre os tratamentos foram determinadas pelos testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher. As associações entre variáveis contínuas foram determinadas usando o método de correlação de Pearson. Os dados são apresentados como média ± erro padrão.

## **4.7 Delineamento Experimental**

### **4.7.1 Efeito do momento da TIFOI após a retirada do implante na recuperação e qualidade embrionária**

Objetivo-se neste experimento avaliar se o tempo que os ovócitos permanecem no folículo antes da ovulação pode afetar o desenvolvimento e a qualidade do embrião. Para isso, a TIFOI foi realizada em momentos diferentes após a retirada do dispositivo de progesterona P4 e os embriões foram coletados oito dias depois. Os complexos cúmulus ovócitos (CCOs) foram obtidos de ovários de abatedouro e, após a seleção, foram distribuídos em 4 grupos, um grupo foi utilizado para a PIV (Controle) e os demais foram utilizados para TIFOI sendo: TIFOI 24- CCOs foram injetados no folículo dominante de vacas ovuladoras 24 h após a remoção do dispositivo P4; TIFOI 36- CCOs foram injetados no folículo dominante de vacas ovulando 36 h após a remoção do implante P4; e TIFOI 52-CCOs foram injetados 52 h após a remoção do implante P4. As fêmeas de todos os grupos foram inseminadas artificialmente (IA) 52 h após a retirada do implante P4. No momento da IA, todas as ovuladoras receberam 1 mL de um análogo do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Gestran, Tecnopec, São Paulo, São Paulo, Brasil). O diâmetro e a irrigação do folículo dominante que recebeu a injeção foram avaliados por ultrassonografia 6 e 12 h após a IA, e posteriormente avaliados a cada duas h até a ovulação. Oito dias após realizou-se a recuperação dos embriões por lavagem uterina. Embriões do grupo controle e dos grupos TIFOI foram avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento e morfologia, em seguida, foram analisados quanto à qualidade por coloração diferencial de células. O esquema ilustrativo do delineamento experimental é apresentado na Figura 1.

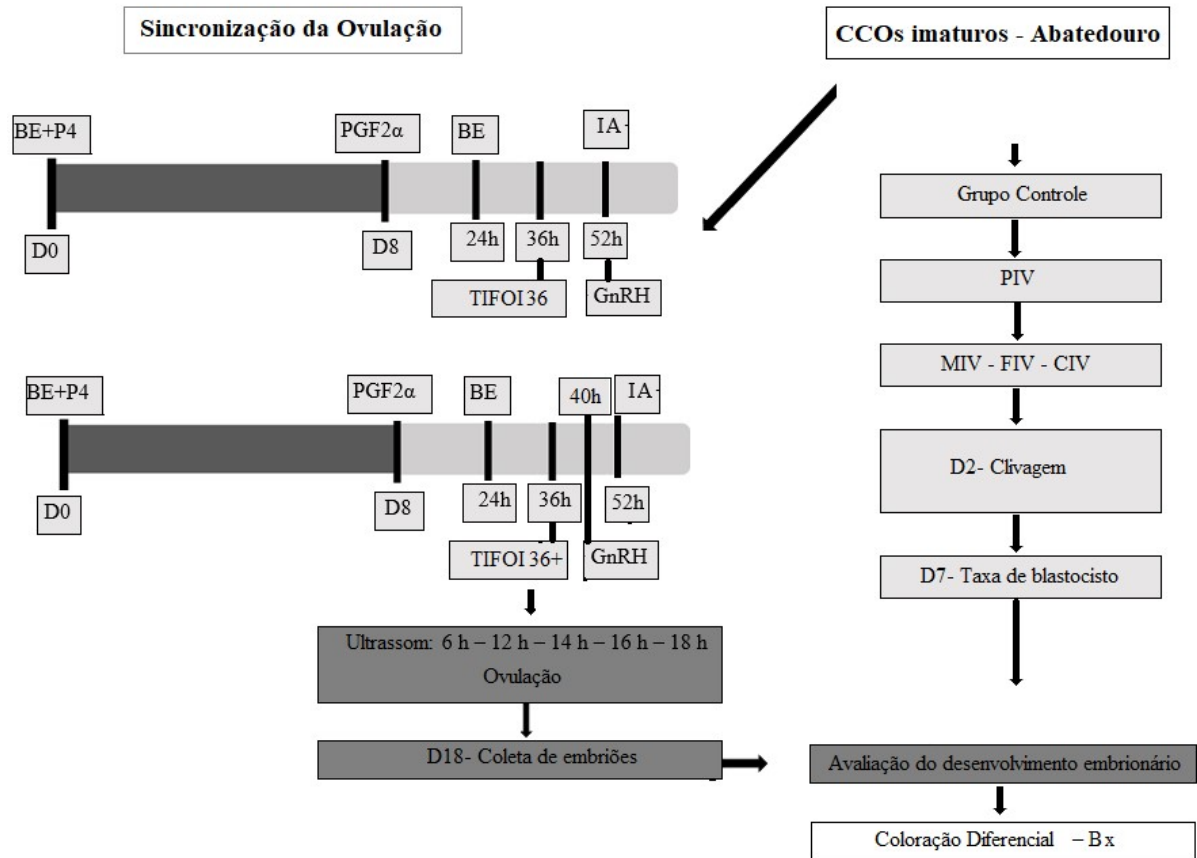


**Figura 1.** Representação esquemática do desenho experimental do experimento 1. No dia 0 (D) as ovuladoras receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) associado à aplicação de benzoato de estradiol (BE). Oito dias depois, o dispositivo de P4 foi removido e os animais receberam uma injeção de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ). No dia 9, foi administrado BE (im). A injeção de ovócitos no folículo pré-ovulatório (TIFOI) foi realizada 24, 36 e 52 h após a remoção da P4. A inseminação artificial (IA) e a indução da ovulação foram realizadas 52 h após a retirada do implante e a coleta dos embriões no D18. No grupo controle os embriões foram produzidos *in vitro* (PIV). Os embriões em estágio do blastocisto expandido (Bx) foram avaliados por coloração diferencial.

#### 4.7.2 Efeito do momento da indução da ovulação após a TIFOI na taxa de recuperação e qualidade embrionária

Objetivou-se neste experimento comparar o efeito de diferentes momentos da indução da ovulação na taxa de recuperação embrionária. Para isso, o protocolo do experimento anterior que deu o melhor resultado (TIFOI 36) foi alterado quanto ao horário da indução da ovulação. CCOs obtidos de ovários de abatedouro foram selecionados e um grupo foi usado para PIV (grupo controle) e os restantes foram injetados no folículo dominante ( $\geq 9$  mm) de vacas ovuladoras 36 h após a retirada do implante de P4, as quais foram submetidas a 2 tratamentos: TIFOI 36: a IA e a indução da ovulação foram realizadas 52 h após a retirada do P4; e TIFOI 36+: a IA foi realizada 52 h e a indução da ovulação 40 h após a remoção do P4. Em todos os tratamentos, oito dias após a IA, a lavagem uterina foi realizada para a

recuperação dos embriões. Os embriões de todos os grupos foram avaliados de acordo com o estágio de desenvolvimento e morfologia e, a seguir, foram utilizados para coloração diferencial de células. O esquema ilustrativo do delineamento experimental é apresentado na Figura 2.



**Figura 2.** Esquema ilustrativo do delineamento experimental do experimento 2. No dia 0 as ovuladoras receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) associado à aplicação de benzoato de estradiol (BE). Oito dias depois, os animais receberam injeção de prostaglandina F2α (PGF2α) e o dispositivo de P4 foi retirado. Após 24 h, 1 mg de BE (im) foi administrado. A injeção de ovócitos no folículo pré-ovulatório (TIFOI) foi realizada 36 h após a retirada da progesterona para os grupos TIFOI 36 e TIFOI 36+ e a inseminação artificial (IA) 52 h após a retirada do implante P4; e 52 (TIFOI 36) e 40 h (TIFOI 36+) após a remoção do P4 receberam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), respectivamente. A coleta dos embriões foi realizada no D18 e os embriões foram avaliados. Bx foram utilizados para coloração diferencial. Para PIV, os embriões foram produzidos conforme protocolo de laboratório e no dia 7 (D7), os Bx foram utilizados para coloração diferencial. Para PIV, os embriões foram produzidos conforme protocolo de laboratório e no D7, os Bx foram utilizados para coloração diferencial.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efeito do momento da TIFOI na recuperação e qualidade embrionária

Nesse experimento foi avaliada a taxa recuperação e qualidade dos embriões quando a TIFOI foi realizada as 24, 36 ou 52 h após a remoção do implante do P4, em que os ovócitos permaneceram por  $40,4 \pm 2,0$ ,  $33,3 \pm 1,8$  ou  $20,3 \pm 1,1$  h dentro do folículo ( $P < 0,05$ ), respectivamente. Os resultados mostraram que o grupo em que os ovócitos foram injetados 36 h após a remoção da P4 (TIFOI 36), ou seja, permaneceram por  $33,3 \pm 1,8$  h no folículo, apresentou maior ( $P < 0,05$ ) taxa de recuperação de estruturas totais (Tabela 6). Além disso, a porcentagem de embriões em estágio de desenvolvimento inicial foi menor no grupo TIFOI 36 com relação ao grupo TIFOI 52, mas a taxa de recuperação de embriões foi similar entre estes grupos. A taxa de estruturas fecundadas foi maior no grupo TIFOI 52 com relação ao grupo TIFOI 36, mas todos os grupos TIFOI tiveram taxas menores de estruturas fecundadas do que o grupo Controle (Tabela 6).

**Tabela 6.** Dados de recuperação de embriões, estruturas, estruturas fecundadas, a partir de ovócitos injetados no folículo pré-ovulatório através da transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) realizada às 24 (TIFOI 24), 36 (TIFOI 36) e 52 h (TIFOI 52) após a remoção do implante de progesterona.

Parâmetro	TIFOI 24	TIFOI 36	TIFOI 52	Controle*	Valor de P
Animais [n]	17	18	21	--	--
Ovócitos injetados ou usados [n]	460	500	565	296	--
Estruturas recuperadas [n (%)]	150 (32,6 <sup>b</sup> )	224 (44,8 <sup>a</sup> )	147 (26,0 <sup>c</sup> )	--	<0,0001
Estruturas fecundadas [n (% <sup>§</sup> )]	92 (61,3 <sup>ab</sup> )	127 (56,7 <sup>a</sup> )	99 (67,3 <sup>b</sup> )	238 (80,4 <sup>c</sup> )	<0,0001
Embriões [n (% <sup>§</sup> )]	18 (12,0 <sup>a</sup> )	36 (16,1 <sup>a</sup> )	37 (25,2 <sup>b</sup> )	90 (30,4 <sup>b</sup> )	<0,0001
Embriões em estágio inicial (MC+Bi)	8 (44,4 <sup>ab</sup> )	8 (22,2 <sup>a</sup> )	18 (48,6 <sup>b</sup> )	23 (25,6 <sup>a</sup> )	0,0250
Degenerados [n (% <sup>†</sup> )]	74 (80,4 <sup>a</sup> )	91 (71,7 <sup>ab</sup> )	62 (62,6 <sup>b</sup> )	148 (62,2 <sup>b</sup> )	0,0069
Rec. verdadeira <sup>‡</sup> [total, n (%)]	136 (29,6 <sup>b</sup> )	207 (41,4 <sup>c</sup> )	128 (22,7 <sup>a</sup> )	--	<0,0001
Rec. verdadeira [embriões, n (%)]	8 (1,7 <sup>a</sup> )	29 (5,8 <sup>b</sup> )	22 (3,9 <sup>b</sup> )	--	0,0049

\* Ovócitos utilizados para produção in vitro de embriões e considerados controle

§ Em relação ao total de estruturas recuperadas (ou usadas no grupo controle)

† Em relação ao total de estruturas fecundadas (ou clivadas no grupo controle)

‡ Excluindo-se um possível embrião da ovuladora

<sup>a,b,c</sup> Médias seguidas de valores diferentes, na mesma linha, diferem (P<0,05)

Os dados relativos ao efeito dos tratamentos nos parâmetros fisiológicos no folículo e do corpo lúteo (CL), são apresentados na Tabela 7. Pode-se notar que o tamanho dos folículos no momento do TIFOI foi semelhante para todos os tratamentos (P > 0,05). No entanto, o tempo que os ovócitos permaneceram dentro do folículo, ou seja, o tempo entre a injeção e a ovulação, foi maior no tratamento com TIFOI 24 do que nos outros tratamentos (P < 0,05). Além disso, o intervalo entre a remoção do implante até a ovulação e o tamanho do CL foram menores no grupo TIFOI 24 e maiores no grupo TIFOI 52 (P < 0,05).

**Tabela 7.** Parâmetros foliculares e luteais após a injeção intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) realizada as após a TIFOI realizada às 24 (TIFOI 24), 36 (TIFOI 36) e 52 h (TIFOI 52) após a remoção do implante de progesterona.

Parâmetro	TIFOI 24	TIFOI 36	TIFOI 52	Valor de P
Animais (n)	17	18	21	
Diâmetro folicular na TIFOI	11,4±0,5	11,5±0,3	12,4±0,4	0,1008
Redução do diâmetro folicular 6h pós TIFOI (%)	-1,8±0,5	-1,8±0,4	-1,6±0,6	0,9560
Redução do diâmetro folicular à ovulação (%)	-0,8±0,4	-1,1±0,3	-2,5±0,7	0,0657
Ovulação (h pós TIFOI)	40,4±2,0 <sup>a</sup>	33,3±1,8 <sup>b</sup>	20,3±1,1 <sup>c</sup>	<0,0001
Ovulação (h pós remoção P4)	64,4±2,0 <sup>a</sup>	69,3±1,8 <sup>ab</sup>	74,3±1,1 <sup>b</sup>	0,0003
Diâmetro CL (mm)	14,6±0,6 <sup>a</sup>	16,0±0,7 <sup>ab</sup>	17,4±0,6 <sup>b</sup>	0,0127

<sup>a, b, c</sup> Médias seguidas de valores diferentes, na mesma linha, diferem (P <0,05)

Abreviaturas: n, número; D9, dia 9; D9,5, dia 9,5; D10, dia 10; TIFOI, transferência intrafolicular de ovócitos imaturos; P4, progesterona; CL, corpo lúteo.

Nove réplicas foram realizadas.

O momento da TIFOI não afetou (P > 0,05) a qualidade dos embriões avaliada pela coloração diferencial (Tabela 8). Todos os grupos apresentaram número total de células semelhante e todos os embriões avaliados tinham a porcentagem de MCI/células totais dentro do limite 20-40%.

**Tabela 8.** Qualidade embrionária de blastocistos expandidos (Bx) resultantes da transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) realizada às 24 (TIFOI 24), 36 (TIFOI 36) e 52 h (TIFOI 52) após a remoção do implante de progesterona (P4) e do grupo Controle.

Parâmetro	Controle*	TIFOI 24	TIFOI 36	TIFOI 52	Valor de P
Embriões (n)	30	5	18	11	
Total de células (n)	189.5±7.1	173.6±8.6	204.9±8.5	209.7±11.7	0.1614
Trofoblasto (n)	129.6±5.5	113.2±3.1	125.9±4.5	129.4±6.0	0.5669
MCI (n)	59.9±3.0 <sup>a</sup>	60.4±7.6 <sup>ab</sup>	79.1±4.5 <sup>b</sup>	80.4±9.1 <sup>b</sup>	0.0038
MCI (%)	31.6 <sup>a</sup>	34.8 <sup>ab</sup>	38.6 <sup>b</sup>	38.3 <sup>b</sup>	<0.0001

\* Ovócitos usados para produção *in vitro* (grupo Controle)

<sup>a, b</sup> Médias seguidas de valores diferentes, na mesma linha, diferem ( $P < 0,05$ ).

Abreviaturas: n, número; MCI, massa celular interna; TIFOI, transferência intrafolicular de ovócitos imaturos;

## 5.2 Efeito do momento da indução da ovulação após a TIFOI na taxa de recuperação embrionária

Quando foi avaliado o efeito de diferentes momentos da indução da ovulação na taxa de recuperação embrionária após TIFOI, observou-se que o tratamento TIFOI 36 apresentou maiores taxas de estruturas e embriões recuperados em comparação com o TIFOI 36+ ( $P < 0,05$ ). Os dados são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Dados de recuperação de embriões, estruturas, estruturas fecundadas, a partir de ovócitos injetados no foliculo pré-ovulatório através da transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) 36 h (TIFOI 36) e 36 h + indução da ovulação 40 h (TIFOI 36+) após a remoção do implante de progesterona.

Parâmetro	TIFOI 36	TIFOI 36+	Valor de P
Animais [n]	14	15	--
Ovócitos injetados [n]	321	356	--
Estruturas recuperadas [n (%)]	84 (26.2)	45 (12.6)	<0.0001
Estruturas fecundadas [n (% <sup>§</sup> )]	48 (57.1)	19 (42.2)	0.1060
Embriões [n (% <sup>§</sup> )]	18 (21.4)	6 (13.3)	0.2601
Embriões jovens (MC + Bi)	5 (27.8)	2 (33.3)	0.7954
Degenerados [n (% <sup>†</sup> )]	30 (35.7)	13 (28.9)	0.4332
Rec. verdadeira <sup>‡</sup> [total, n (%)]	75 (23.4)	38 (10.7)	<0.0001
Rec. verdad. [embriões, n (%)]	14 (4.4)	4 (1.1)	0.0089

<sup>§</sup> Em relação ao total de estruturas recuperadas

<sup>†</sup> Em relação ao total de estruturas fecundadas

<sup>‡</sup> Excluindo-se um possível embrião da ovuladoras

Médias seguidas de valores diferentes, na mesma linha, diferem ( $P < 0,05$ )

Onze réplicas foram realizadas.

Quando os parâmetros associados à fisiologia folicular e luteal foram analisados, os tratamentos não diferiram entre si ( $P < 0,05$ ). Os dados são apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Análise de parâmetros associados a fisiologia folicular e luteal. Diâmetro folicular na transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI), redução do diâmetro folicular 6h pós TIFOI (%), redução diâmetro folicular à ovulação (%), ovulação após a TIFOI (h pós TIFOI), ovulação (h pós remoção P4), diâmetro do corpo lúteo (CL) (mm) no D18, de vacas ovuladoras submetidas à TIFOI 36 h (TIFOI 36) e 36 h + indução da ovulação 40 h (TIFOI 36+) após a remoção do implante de progesterona.

Parâmetro	TIFOI 36	TIFOI 36+	Valor de P
Animais (n)	14	15	--
Ovócitos injetados	22.9±0.7	23.7±0.6	0.3754
Diâmetro folicular na TIFOI	12.4±0.4	12.4±0.5	0.9876
Redução 6h pós TIFOI (%)	-1.8±0.3	-1.5±0.6	0.7364
Redução a ovulação (%)	-1.6±0.6	-1.6±0.5	0.9780
Ovulação (h pós TIFOI)	33.4±1.3	35.1±1.0	0.4396
Ovulação (h pós remoção P4)	69.4±1.3	71.1±1.0	0.4396
Diâmetro CL (mm)	16.6±0.9	16.8±0.6	0.7938

Médias seguidas de valores diferentes, na mesma linha, diferem (P <0,05).

Abreviaturas: n, número; TIFOI, transferência intrafolicular de ovócitos imaturos; P4, progesterona; CL, corpo lúteo.

Na avaliação da qualidade embrionária, não houve diferença entre os tratamentos Controle, TIFOI D36 e TIFOI 36+. Dados apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Dados da qualidade embrionária de blastocistos expandidos (Bx) resultantes da transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) 36 h (TIFOI 36) e 36 h + indução da ovulação 40h (TIFOI 36+) após a remoção do implante de progesterona; e do grupo Controle.

Parâmetro	Controle*	TIFOI 36	TIFOI 36+	Valor de P
Embriões (n)	29	5	1	
Total de células (n)	196.4±2.5	180.0±13.6	--	0.0511
Trofoblasto (n)	142.0±3.5	125.4±7.2	--	0.0720
MCI (n)	54.4±3.0	54.6±7.3	--	0.9847
MCI (%)	27.7	30.3	24.7	0.1395

\* Ovócitos usados para produção *in vitro* (PIV).

Médias seguidas de diferentes valores, na mesma linha, diferem (P <0,05).

## 6 DISCUSSÃO

A técnica de TIFOI surge como uma nova alternativa para a produção de embriões bovinos. Apesar de estudos terem mostrado que utilizando essa técnica é possível obter embriões e bezerros saudáveis (Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017) seus resultados ainda são insatisfatórios. Isso porque a taxa de recuperação embrionária, ainda é de aproximadamente 10% (Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017; Andrlíkova et al., 2020). Para esclarecer e avaliar alguns fatores que possam afetar os resultados da técnica, levantou-se a hipótese de que o momento em que os ovócitos são injetados no folículo da vaca ovuladoras após a remoção do implante de P4 poderia afetar a taxa de recuperação e qualidade embrionárias. Além disso, o momento da indução da ovulação também poderia afetar estes dois parâmetros. Isto porque, levou-se em consideração o momento do pico pré-ovulatório de LH, baseando-se em estudos que já mostraram que utilizando protocolo de sincronização de vacas Nelore, semelhante ao utilizado no presente estudo, a ovulação ocorrerá dentro de 27 a 30 h após o pico de LH e de 68 a 72 h após a remoção do implante de P4 (Hanlon et al., 1997; Lammoglia et al., 1998; Peralta-Torres et al., 2010; Pfeifer et al., 2014). Assim, este pico é extremamente importante para retomada da meiose, ovulação e posterior fecundação dos ovócitos utilizados durante a injeção.

Para testar essa hipótese, CCOS foram injetados em folículos de vacas ovuladoras em diferentes momentos após a retirada do implante de P4 (24, 36 e 52 h), de forma que os CCOs permanecessem nos folículos por diferentes períodos. Os resultados mostraram que a recuperação de estruturas totais foi maior no grupo TIFOI 36, já a taxa de recuperação embrionária foi semelhante entre os grupos. Esta taxa de recuperação embrionária (TIFOI 36 e TIFOI 52) foi próxima às observadas por Sprícigo et al. (2016); Sprícigo & Dode (2017); e Andrlíkova et al. (2020), e diferentes dos encontrados por Hoelker et al. (2017). Já a recuperação de estruturas foi semelhante entre todos estes trabalhos Sprícigo et al., (2016), Sprícigo & Dode (2017), Hoelker et al. (2017) e Andrlíkova et al. (2020).

Vale destacar que o protocolo de sincronização utilizado neste estudo foi semelhante ao utilizado por Sprícigo et al. (2016), sendo alterado apenas o momento da injeção dos ovócitos no folículo pré-ovulatório. Desta forma, esperava-se que o tempo de permanência dos ovócitos no folículo pudesse alterar a taxa de recuperação embrionária após a TIFOI. Isto por que, alguns estudos mostraram que ovócitos expostos ao pico de LH *in vivo* tiveram maiores chances de se tornarem embriões viáveis após a fecundação (Blondin et al., 2002; Dieleman et al., 2002), e a tentativa do presente estudo era de expor os ovócitos injetados nos folículos pré-ovulatórios em diferentes momentos com relação ao pico de LH. O que foi observado é que quando os ovócitos foram expostos ao ambiente folicular 4-6 h (TIFOI 36) antes do pico pré-ovulatório de LH a recuperação embrionária foi semelhante de quando foram injetados 10-12 h após o pico de LH (TIFOI 52), mas a taxa de recuperação de estruturas foi maior.

De acordo com os resultados mostrados para ovulação após a injeção, os tratamentos que apresentaram maior taxa de recuperação embrionária (TIFOI 36 e TIFOI 52) apresentaram o tempo de ovulação dentro do esperado. No entanto, quando a injeção de ovócitos foi realizada mais cedo (TIFOI 24), isto parece interferir na fisiologia folicular, antecipando a ovulação e reduzindo o tamanho do corpo lúteo.

Vale ressaltar que o tempo em que os ovócitos permaneceram no folículo após a injeção afetou a taxa de recuperação embrionária, mas não a qualidade dos embriões. No entanto, a qualidade dos embriões produzidos pela TIFOI foi semelhante àqueles *in vitro*, visto pela proporção da MCI / Total de células entre 20 e 40% (Russel et al., 2006), o que não era esperado. Portanto, a tentativa de se produzir um embrião de melhor qualidade com relação ao embrião PIV, ainda não foi alcançada. No entanto, foi utilizado apenas um parâmetro para avaliar a qualidade embrionária e um número pequeno de embriões foi utilizado nas avaliações. Possivelmente, se outras características fossem avaliadas, como criotolerância, análise de expressão gênica, transferência de embriões, taxa de prenhez, os resultados poderiam ser diferentes.

Apesar disso, quando se observa os dados de maneira geral, a TIFOI realizada mais próximo da ovulação (TIFOI 52) resultou em maior percentual de estruturas fecundadas e de embriões, com relação ao número total de estruturas recuperadas, sendo semelhante ao grupo Controle. Porém, por apresentar menor taxa de recuperação de estruturas, optou-se por tentar melhorar o tratamento que apresentou maior taxa de recuperação de estruturas (TIFOI 36). Isto por que, o objetivo principal deste estudo foi tentar melhorar a eficiência da técnica, visto pela taxa de recuperação embrionária após a injeção. Então, o segundo experimento foi

delineado com o objetivo de melhorar este tratamento. Para isso, o horário da indução da ovulação foi ajustado para 40 h após a remoção do implante de progesterona, como era o esperado que ocorreria *in vivo*, de acordo com o protocolo de sincronização utilizado (Hanlon et al., 1997). Assim, as vacas que não tivessem o pico pré-ovulatório 16-18 h após a administração do BE, possivelmente teriam o estímulo pela administração do análogo do GnRH e duas h depois, possivelmente teriam o pico pré-ovulatório do LH. Então, utilizou-se o tratamento TIFOI 36 e o TIFOI 36+ (ovuladoras receberam a indução da ovulação 40 h após a remoção do implante de P4).

A tentativa de melhoria na taxa de recuperação embrionária não foi alcançada e a qualidade embrionária não diferiu entre os tratamentos, assim como a ovulação não foi afetada. A antecipação da indução da ovulação teve efeito negativo na recuperação embrionária e de estruturas, mas não interferiu na ovulação. Vale destacar que, quando outros autores (Sprícigo et al., 2016; Andrlíkova et al., 2020) realizaram a TIFOI, várias etapas da técnica foram diferentes, desde a utilização do protocolo de sincronização de ovuladoras, meio e quantidades diferentes para realizar a injeção dos ovócitos, diâmetro das agulhas utilizadas para injeção, número de ovócitos injetados, sistema de injeção, e até a raça das ovuladoras, Holandesa e Nelore. Mesmo assim, a taxa de recuperação de estruturas e embriões se aproximaram. No entanto, quando se compara o trabalho realizado por Hoelker et al., (2017), que apresentou a taxa mais elevada de recuperação embrionária já mencionada sobre a utilização da TIFOI, vale destacar que apesar desses autores utilizarem uma metodologia diferente do presente estudo, o trabalho realizado por Andrlíkova et al. (2020) utilizou o mesmo protocolo de sincronização do trabalho citado, mudando apenas o sistema de injeção utilizado, e apresentou taxa de recuperação de estruturas semelhante ao estudo citado e ao presente estudo.

Diante disso, pode-se sugerir que o maior problema relacionado à recuperação embrionária parece não estar associado à sincronia entre a injeção e a ovulação, mas na injeção propriamente dita. Isto é refletido quando se observa a proporção de estruturas e embriões que não foram recuperados após a TIFOI, ainda não se sabe qual o destino dos mesmos. Por isso, mais estudos são necessários para investigar o efeito da injeção de ovócitos no folículo pré-ovulatório, desde um possível efeito no ambiente folicular, alterando a composição do líquido folicular e até a resposta imune do mesmo em relação aos ovócitos injetados e na ovulação.



## **7 CONCLUSÕES**

Em conclusão, o tempo de permanência dos ovócitos no folículo pré-ovulatório após a injeção afeta a taxa de recuperação embrionária, mas não a qualidade dos embriões. Portanto, a injeção de ovócitos realizada mais cedo parece interferir na fisiologia folicular, antecipando a ovulação e reduzindo o tamanho do CL. Além disso, a indução antecipada da ovulação afeta a taxa de recuperação embrionária, mas não a ovulação.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRLIKOVA, M.; BINA, V.; KOS, V.; LOPATAROVA, M.; MARKOVA, B.; STENCLOVA, L.; CECH, S. Intrafollicular oocyte transfer in cattle – a technical report. **Acta Veterinaria Brno**. v. 89, p. 11-17, 2020.

BLOCK, J.; FIELDS, S. D; HANSEN, P. J. **Simple protocol for differential staining of inner cell mass and trophoctoderm of bovine embryos** – 2009. Disponível em: <[http://animal.ifas.ufl.edu/hansen/lab\\_differential\\_staining\\_bovine\\_embryos.pdf](http://animal.ifas.ufl.edu/hansen/lab_differential_staining_bovine_embryos.pdf)>. Acesso em: 20/01/2020.

DEMETRIO, D.G.B.; BENEDETTI, E.; DEMETRIO, C.G.B.; FONSECA, J.; OLIVEIRA, M.; MAGALHAES, A.; SANTOS, R.M. How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced *in vitro*? (12 years of practical results at a California dairy farm). **Animal Reproduction**. v. 17, n. 3: e20200053, p. 1-13, 2020.

HANLON, D. W.; WILLIAMSON, N.B.; WICHTEL, J.J. Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 963-975, 1997.

HOELKER, M.; KASSENS, A.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCK, I. C.; TEFAYE, D.; NEUHOFF, C.; SCHELLANDER, K.; HELD- HOELKER, E. Birth of healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 15; n. 97, p. 41-49, 2017.

KASSENS, A.; HELD, E.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI, C.; TEFAYE, 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, 2015.

LAMMOGLIA, M.A., R.E. SHORT, S.E. BELLOWS, R.A. BELLOWS, M.D. MACNEIL AND H.D. HAFS. Induced and synchronization estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in peripuberal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone releasing insert and prostaglandinF2 $\alpha$ . **Journal Animal Science**, v. 76, p. 1662-1670, 1998.

MACHADO, G.M; CARVALHO, J.O; FILHO, E. S; CAIXETA, E.S; FRANCO, M.M; RUMPF, R.; DODE, M.A. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n.8, p. 1289-1297, 2009.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995.

PERALTA-TORRES, J.; LOPES, J.A.; CASTRO, F.C. Comparison of estradiol cypionate and estradiol benzoate effects on ovaric activity, estrus and ovulation on anestrus *Bos indicus* cows. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 3, p. 466-470, 2010.

PFEIFER, L.F., LEONARDI, C.E., CASTRO, N.A., VIANA, J.H., SIQUEIRA, L.G., CASTILHO, E.M., SINGH, 436 J., KRUSSER, R.H., RUBIN, M.I. The use of PGF2alpha as ovulatory stimulus for 437 timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, p. 689-695, 2014.

ROBERTSON, I.; NELSON, R.E. Certification and identification of the embryo. In: Stringfellow D, Seidel SM (Ed.). **Manual of the International Embryo Transfer Society**. IETS, Savoy, IL, USA. p.103-134, 1998.

RUSSELL, D. F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D. H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 10, p. 1255–70, 2006.

SARTORI, R.; PRATA, A. B.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SANCHES, B. V.; PONTES, G. C. S.; VIANA, J. H. M.; PONTES, J. H.; VASCONCELOS, J. L. M.; PEREIRA, M. H. C.; DODE, M. A. N.; MONTEIRO JR, P. L. J.; BARUSELLI, P. S. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Anim Reprod**, v. 13, p. 300-312, 2016.

SPRÍCIGO, J. F. W.; SENA NETTO, S. B.; MUTERLLE, C. V.; RODRIGUES, S. A. D.; LEME, L. O.; GUIMARÃES, A. S.; CAIXETA, F.M.; FRANCO, M.M.; PIVATO, I. DODE, M.A. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 86, p. 2054–2062, 2016.

SPRÍCIGO, J.F.W.; DODE, M.A.N. Transferência intrafollicular de ovócitos imaturos (TIFOI) em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.25-32, 2017.

TAKAHASHI, T.; SASAKI, K.; SOMFAI, T.; NAGAI, T.; MANABE, N.; EDASHIGE, K. N, N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves in vitro development of bovine embryos. **The Journal of Reproduction and Development**, v.62, p. 209-12, 2016

WRENZYCKI, C. In vitro culture systems: how far are we from optimal conditions? **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 279-282, 2016.

ZULLO, G.; ALBERO, G.; NEGLIA, G.; DE CANDITIIS, C.; BIFULCO, G.; CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro-produced embryos. **Theriogenology**, v.85, n. 4, p.668-97, 2016.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de biotecnologias da reprodução animal permite a multiplicação de animais com características desejáveis no rebanho de maneira rápida e eficiente. A busca pela melhoria na qualidade embrionária e, conseqüentemente, melhores resultados quanto às taxas de prenhez e nascimento após a transferência de embriões frescos e criopreservados, tem sido realizada por profissionais da área. A TIFOI é uma técnica que tenta otimizar o aproveitamento da doadora e garantir que o embrião produzido seja de boa qualidade. Isso porque, as etapas de maturação, fecundação e cultivo são realizadas em ambiente *in vivo* no organismo da ovuladora.

Alguns estudos têm mostrado o interesse pelo desenvolvimento da TIFOI como alternativa para melhorar as condições de maturação ovocitária e um melhor ambiente para o desenvolvimento embrionário, evitando as injúrias que são causadas pelo ambiente *in vitro*. Isto por que, a técnica se tornou atrativa quando foram relatados os nascimentos dos primeiros bezerros saudáveis a partir desta.

Apesar disso, a TIFOI está em fase de desenvolvimento e precisa apresentar resultados estáveis para poder ser comparada às outras técnicas já utilizadas comercialmente. Para isso, os estudos relacionados à TIFOI têm buscado o aumento na taxa de recuperação embrionária, de maneira a investigar vários fatores que podem interferir no resultado da técnica.

A proposta do presente estudo foi de investigar vários fatores que pudessem afetar a produção de embriões a partir da mesma: (1) avaliar a eficiência maturação nuclear dos ovócitos injetados no folículo dominante; (2) avaliar a funcionalidade da maturação, observando o desenvolvimento embrionário posterior; (3) avaliar se o número de ovócitos injetados no folículo poderia afetar a taxa de ovulação e a recuperação embrionária; (4) verificar se o tempo em que os ovócitos permanecem no folículo após a injeção afetaria a taxa de recuperação embrionária; (5) comparar se o momento da indução da ovulação afetaria a taxa de recuperação embrionária.

Quando avaliou-se a maturação nuclear, foi constatado que a maturação de ovócitos submetidos à TIFOI é semelhante à maturação *in vitro*. Além disso, o tempo que os ovócitos ficam no folículo é o suficiente para que ocorra essa maturação, sejam fecundados e se desenvolvam em embriões.

Outra questão importante esclarecida neste estudo foi que o número de ovócitos injetados no folículo dominante não afeta a ovulação, nem a recuperação embrionária, mas afeta o número de estruturas recuperadas, ou seja, o maior número de ovócitos injetados (50) apresentou a maior recuperação de estruturas. Com isso, ao realizar a injeção de ovócitos, a escolha pelo número de ovócitos a serem utilizados deve atender a quantidade de vacas ovuladoras disponíveis, assim como o número de ovócitos recuperados por OPU, de maneira a não desperdiçar muitos ovócitos em uma só doadora, pois a mesma pode vir a não ovular.

Foi observado também que o momento em que os ovócitos são injetados no folículo dominante afeta a taxa de recuperação embrionária, ou seja, o tempo que eles permanecem no folículo afeta negativamente a taxa de recuperação embrionária, ovulação e o diâmetro do corpo lúteo. No entanto, isso não afetou a qualidade embrionária.

Quando o momento da indução da ovulação foi comparado, observamos que não houve melhoria na taxa de recuperação embrionária, e isso não alterou a ovulação e qualidade embrionária.

Apesar da tentativa de melhoria da eficiência da TIFOI, ainda não foi alcançada. Portanto, mais estudos precisam ser elaborados para continuar a busca pelo aumento da taxa de recuperação embrionária após a TIFOI. No entanto, este estudo esclareceu alguns fatores que são importantes para o desenvolvimento da técnica.