

Da fertilização à criopreservação dos embriões de bovino: Fatores condicionantes e a sua otimização

Dissertação de Mestrado

Selma Amarante Furnas

Mestrado em

Engenharia Zootécnica



Da fertilização à criopreservação dos embriões de bovino: Fatores condicionantes e a sua otimização.

Tese de Mestrado

Selma Amarante Furnas

Orientadores

Professor Doutor Joaquim Fernando Moreira da Silva

Tese de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Zootécnica



Resumo

A produção de embriões de bovino *in vitro* é a chave para o desenvolvimento do setor agropecuário a nível mundial. No entanto, comparativamente com outros setores, ou até mesmo outros ramos da agropecuária, a produção *in vitro* de embriões ainda é uma dificuldade nesta área.

Esta dificuldade está relacionado com os diferentes fatores que afetam esta técnica nas suas diferentes etapas: recolha e maturação dos ovócitos; recolha e capacitação do sémen; fertilização e cultura dos embriões fertilizados. Contudo, diferentes investigadores têm-se dedicado à resolução dos diferentes problemas que surgem ao longo do seu desenvolvimento, de forma a otimizar todo o processo.

De uma forma geral, esses problemas estão relacionados com a manutenção da integridade dos gametas após a sua colheita, proporcionamento das condições ótimas de maturação, fertilização e posterior desenvolvimento embrionário. Todas estas etapas são suportadas por diferentes meios, em que a sua otimização passa pelo incremento da sua qualidade e similaridade com o ambiente *in vivo*. Todo este processo passa-se essencialmente pela adição de diferentes compostos nas quantidades fisiológicas, bem como as condições ambientais adequadas. Quanto à maturação, estes compostos vão desde diferentes hormonas até agentes antioxidantes. Na etapa seguinte, a fertilização, para além da capacitação espermática adequada, a otimização passa também pela potencialização dos meios, de modo a que estes permitam a junção entre os gametas, tal como o desenvolvimento embrionário ao longo de toda a sua cultura.

De entre os inúmeros estudos desenvolvidos, no que diz respeito à adição de diferentes compostos aos meios, os mais recentes passam pela adição de diferentes aminoácidos, como é o caso da L-Arginina, que está relacionada com a inibição do desenvolvimento da apoptose nas células embrionárias, de diferentes antioxidantes, como a crócina, como também de moléculas recetoras como CaSr (Recetor sensor de cálcio), e até mesmo na modificação dos diferentes métodos de avaliação morfológica dos embriões, que passa não só pela observação microscópica como também pela sua medição.

Após o desenvolvimento dos embriões em laboratório, o meio científico depara-se com mais um problema, a viabilidade após criopreservação destes embriões. Tal dificuldade é apontada essencialmente pela excessiva acumulação lipídica em embriões de bovino produzidos *in vitro*, em resultado da adição de macromoléculas aos meios de cultura. Contudo, ao contrário do que tem vindo a ser descrito, a sua presença é essencial. No entanto

esta deve ser em quantidades reduzidas. O processo pelo qual se dá essa excessiva acumulação não está completamente definido, no entanto, existem trabalhos que apontam para a incompleta maturidade das mitocôndrias que não degradam os lípidos. Porém esta excessiva acumulação interfere no processo de congelação dos embriões, mais propriamente na fase de transição lipídica.

No sentido de aumentar a viabilidade embrionária após criopreservação, diferentes autores têm demonstrado que esta pode ser realizada através da adição de alguns agentes lipídicos aos meios, como é caso do ácido linoleico conjugado (CLA) e do Forskolin, onde se nota uma redução lipídica aquando da sua presença nos meios de cultura. Isto através da estimulação da lipólise pelos mesmos.

No entanto, todos os processos de fertilização *in vitro* não dispensam a rigorosidade da manipulação de todo o material, biológico e não biológico, em cada etapa, nem de assépcia ao longo de todo o processo. Por fim, para que todos os avanços sejam promissores no sector agrícola, há que dar o passo para a industrialização, que passa pela avaliação da adição dos diferentes elementos, a longo prazo.

Palavras-Chave: Bovinos; embriões; *in vitro*; fertilização; criopreservação; lípidos.

Abstract

The *in vitro* production of embryos is the key for the development of the agricultural field in the world. However, when compared with other sectors, the *in vitro* production of embryos is yet a dilemma in this area.

It is related with different factors that affect this technique in different steps: oocyte collection and maturation; semen collection and capacitation; fertilization and culture of embryos fertilization. Despite that, different scientist are trying to understand the problems that appears during the development, with the objective to optimize all of process.

Generally these problems are related with maintenance of the integrity of the gametes after collection, providing excellent maturation, fertilization and subsequent embryonic development conditions. All of these steps are supported by different mediums, which are optimized by increasing the quality and it's similarity with *in vivo* environment. All of this process pass, essentially, by adiction of different compounds in physiological quantities, as well as the appropriate environment condittions. Regarding maturation, this compounds goes from different hormones to antioxidant agents. In the next step, fertilization, despite the correct espermatic capacitacion, the optimization also pass by the enhancement of the mediums, allowing the junction between the gametes, like a embryonic development along all culture.

Among the innumerable studies developed, regarding the addition of different compounds into the medium, the most recent is the addition of different amino acids, like a L-arginine, which is related with the inhibition of apoptosis development in embryonic cells, different antioxidants, like Cronin, also receptor molecules, as a CaSr (Calcium Detection Receptor) and even in the modification of differents methods of morphological evaluation of embryos, which it does not pass only by microscopic observation, but also by its measurement.

After the embryonic development of embryos in the lab, the scientific milieu have one more problem, the viability of the embryos after cryopreservation. This difficulty is essentially caused by the excessive lipid accumulation in *in vitro* bovine embryos, in result of the addition of macromolecules into culture medium. However, against what has been described, its presence is essential but it must be in reduced quantities. The process regarding this excessive accumulation is not completely defined, although, there are articles that point to the incomplete maturity of mitochondria that does not degrade the lipids. This excessive acumulation interfere with embryo freezing process, more properly in the lipid transition phase.

With the objective to increase the embryonic viability after criopreservation, different authors have demonstrated that it can be performed by the addition of some lipolytic agents into the medium, such as CLA (Conjugated Linoleic Acid) and Forskolin, where a lipid reduction is noted upon its presence in the culture media, by the stimulation of lipolysis.

However, all process of *in vitro* fertilization does not exclude the rigorous handling of all material, both biological and non-biological, in each step, and does not exclude the hygiene throughout the entire process.

Despite all, advances are promising in agricultural field, and we must take a step to the industrialization, which passes by the evaluation of adding different compounds, in long-term.

Key-words: Bovine; embryos; *in vitro*; fertilization; criopreservation; lipids.

Índice

RESUMO	III
ABSTRACT	V
ÍNDICE	VII
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. NOTA HISTÓRICA SOBRE O PERCURSO DA FERTILIZAÇÃO IN VITRO ATÉ À TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, PARA USO NA PRODUÇÃO ANIMAL	3
1.1. Aplicações e limitações de FIV	4
2. DIFERENTES ETAPAS DA FERTILIZAÇÃO IN VITRO E SEUS FATORES CONDICIONANTES ..	6
2.1 Recolha, maturação e seleção dos ovócitos	6
2.1.1 Recolha	6
2.1.2 Maturação	7
2.1.3 Seleção	9
2.1.4 Fatores que afetam a maturação in vitro	10
2.2 Recolha de sémen e capacitação espermática	14
2.2.1 Recolha de sémen	14
2.2.2 Capacitação espermática	14
2.2.3 Fatores espermáticos que afetam a fertilização in vitro	15
2.3 Fertilização in vitro	16
2.4 Cultura e desenvolvimento embrionário	17
2.4.1 Classificação dos embriões	18
2.4.2 Problemas associados à cultura de embriões in vitro	20
3. OTIMIZAÇÃO DA FERTILIZAÇÃO IN VITRO EM BOVINOS	23
3.1 Progressos no meio de maturação	23
3.2 Progressos na fertilização in vitro/ no meio de cultura	26
4. CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES	33
4.1 Cristalização	34
4.2 Efeito da solução	35
4.3 Presença de um crioprotetor no meio de congelação	36
4.4 Velocidade de arrefecimento	37
4.5 Temperaturas de armazenamento no estado congelado	38
4.6 Velocidade de descongelação	38
4.7 Remoção do crioprotetor do embrião	39

5. MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO.....	41
5.1. Vitrificação	41
5.2. Congelação lenta	42
6. CRIOTOLERÂNCIA E COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DOS EMBRIÕES DE BOVINO PRODUZIDOS IN VITRO	45
6.1. Natureza, composição e interação das reservas lipídicas.....	46
6.2. Lípidos, reguladores metabólicos e criopreservação de embriões	48
6.2.1 Reguladores metabólicos.....	49
III. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	53
IV. BIBLIOGRAFIA.....	59

I. Introdução

Atualmente técnicas recentes de ultrassonografia e biologia molecular, aplicadas à reprodução em bovinos, permitiram um conhecimento mais profundo da fisiologia da dinâmica folicular resultando no controlo da atividade ovárica, permitindo o uso de biotecnologias como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) com resultados promissores na área da produção bovina. Assim, todos os avanços biológicos e tecnológicos têm levado ao desenvolvimento de quatro gerações de tecnologias de reprodução assistida, sendo primeira geração a inseminação artificial, criopreservação de gametas e de embriões; a segunda geração a superovulação e transferência de embriões. Já a terceira geração está ligada à sexagem espermática e embrionária, recuperação de ovócitos e a fertilização *in vitro*. Por fim, a quarta geração envolve a clonagem por transferência nuclear de células embrionárias ou somáticas, a transgênica e a biologia de células estaminais (Bertolini and Bertolini, 2009; Vieira, 2012).

Relativamente à inseminação artificial, após em 1949 se ter conseguido congelar sémen, trata-se da técnica mais usada na produção animal sendo a que melhores resultados produz em termos de melhoramento genético dos animais. Esta técnica está atualmente largamente vulgarizada, sendo utilizada em praticamente todas as explorações de produção quer de carne quer de leite (Bertolini and Bertolini, 2009).

Relativamente à transferência de embriões em bovinos, apesar de na Europa existirem equipas em cerca de 31 países, apenas 180 destas se encontram registadas e legalizadas, e apenas 69% fornecem dados à associação europeia de transferência de embriões (A. E. T. E, 2015). Os resultados publicados por esta associação dão conta que em 2015 foram registadas 20497 colheitas de embriões, dos quais 79% foram realizadas em raças de leite e 21% em raças de carne, resultando na produção de 127980 embriões transferíveis. Ainda a nível europeu, foram produzidos *in vitro* 13780 embriões transferíveis, a partir de 9092 manipulações registadas, em apenas oito países (Áustria, Finlândia, França, Alemanha, Itália, Holanda, Federação Russa e Espanha) (A. E. T. E, 2015).

Em Portugal, existem 10 equipas de transferências de embriões, registadas, sendo este o quinto país com um maior número de equipas de todos os países europeus com equipas registadas. Das 10 equipas legalizadas, apenas 5 comunicam os resultados à AETE (Associação Europeia de Transferência de Embriões), tendo esta associação publicado que em

2015 foram registados um total de 609 transferências de embriões das quais 124 foram em fresco e 485 congelados, apenas em raças de leite, não estando registadas colheitas em animais de raças de carne (A. E. T. E, 2015).

A fertilização *in vitro* é uma técnica laboratorial que compreende diferentes etapas, a recolha e maturação dos ovócitos; recolha e capacitação do sêmen; fertilização e por fim cultura dos embriões fertilizados, por um período de cerca de uma semana, até os embriões atingirem o estado de morula/blastocisto. Concluídas estas etapas estes embriões podem ser alvos de investigação científica, transferidos para recetoras ou ainda criopreservados, os quais, tal como os produzidos *in vivo*, podem ser posteriormente transferidos, quer no país onde foram produzidos ou eventualmente exportados.

A criopreservação dos embriões é realizada por duas técnicas: a vitrificação e a congelação lenta. Apesar destas técnicas apresentarem vantagens, como por exemplo a conservação do material genético e a dissociação na cronologia das operações de coleta e transferência de embriões, apresentam também desvantagens, sendo uma delas associada à menor taxa de sobrevivência após o processo de criopreservação e posterior descongelamento, as quais são mais acentuadas quando os embriões são produzidos *in vitro*. Estudos indicam que este facto está associado à excessiva acumulação de lípidos por parte destes embriões (Massip, 2001; Abe and Hoshi, 2003).

A técnica da clonagem obteve grandes avanços na primeira metade do século 20, até que, em 1952, a equipa do Dr. Robert Briggs, da Filadélfia, EUA, clonou um sapo a partir de uma célula embrionária, removendo o núcleo de um embrião de sapo o qual foi inserido numa célula da mesma espécie. Apesar das pesquisas em mamíferos e ovinos terem começado, respetivamente em 1970 e 1979, esta técnica passou a ter grande visibilidade a partir dos trabalhos desenvolvidos por Ian Wilmut, e Keith Campbell, que deram origem ao nascimento da ovelha Dolly em 1996. Esta técnica envolve a produção de animais geneticamente idênticos, embora seja uma técnica que possua ainda pouca eficácia. Para além disso, apesar da aposta na produção animal, esta tem sido essencialmente direcionada para a medicina, mais propriamente na produção de tecidos a partir das células estaminais. Esta técnica levanta grandes problemas éticos, no sentido do colapso de espécies, devido à excessiva seleção genética (Zatz, 2004; Santos, 2008).

Desta forma, esta revisão bibliográfica tem como objetivo abordar os fatores condicionantes, bem como a otimização das técnicas da fertilização *in vitro*, desde a recolha de gâmetas até à criopreservação de embriões de bovino produzidos *in vitro*. Possibilitando

uma visão global de parâmetros associados à evolução na produção de embriões de bovino em laboratório.

II. Revisão Bibliográfica

1. Nota histórica sobre o percurso da fertilização *in vitro* até à transferência de embriões, para uso na produção animal

A fertilização *in vitro* tem tido diversas aplicações em diferentes ramos da ciência e desde os primeiros relatos em 1878, associada à descoberta da capacitação espermática, tem evoluído extraordinariamente. Os anos 1950 e 1960 foram considerados a "Idade de ouro" da fertilização *in vitro*, onde foram descritos os primeiros êxitos convincentes para várias espécies importantes, incluindo leporídeos, bovinos e humanos. Assim, da fertilização *in vitro* à transferência dos embriões produzidos foi um longo caminho na área da reprodução animal e uma mais valia na economia e no desenvolvimento das atividades agrícolas (Bavister, 2002), nomeadamente na bovinicultura quer de leite, quer de carne (Figueiredo *et al.*, 2002; Betteridge, 2003). Entre 1920 e 1930, houve o início de intercâmbios transatlânticos, demonstrando que a transferência de embriões poderia ser de valor prático para a agricultura. Passado uns anos, em 1942, o governo britânico realizou a criação do primeiro centro de inseminação artificial para a criação de gado na Europa. Um grande salto nesta área foi também em 1949, por Polge *et al.*, a descoberta do efeito do crioprotector glicerol em espermatozoides de mamíferos, acrescentando feitos incalculáveis sobre a produção animal em geral, e transferência de embriões (Betteridge, 2003).

Continuando, em 1950, a fundação para o estudo da genética registou o primeiro bezerro nascido a partir da transferência de embriões em fresco. Logo de seguida, em 1956, Royal Veterinary College, in London, relataram a primeira transferência bem-sucedida de embriões cultivados *in vitro*. Trabalhos no sentido de aperfeiçoar toda a técnica, desde a produção até a transferência, foram surgindo, como é o caso de Hunter, Averill, Rowson e Movore, que em 1955, 1958 e 1960, aperfeiçoaram os métodos cirúrgicos de recuperação embrionária e transferência em ovinos, que viriam a ser posteriormente aplicados nos bovinos (Bavister, 2002). Outro feito destacado foi o de Sugie, que em 1965 obteve sucesso com uma abordagem transvaginal, contornando o colo do útero, para depositar o embrião no lúmen uterino numa fêmea de bovino (Sugie, 1965). Seguidamente, em 1969 e 1972 Rowson e colaboradores (Rowson *et al.*, 1969; 1972) obtiveram bons resultados em bovinos. Em 1974,

Whittingham e Whitten demonstraram o potencial para o transporte de embriões congelados, culminando com a exportação de embriões de bovino congelados de Inglaterra para Nova Zelândia em 1976 (Whittingham and Whitten, 1974). Para além disso, em 1977 Iritani e Niwa iniciaram os estudos sobre a maturação e subsequente fertilização *in vitro*, tendo o primeiro bezerro proveniente da fertilização *in vitro*, nascido em 1982 produzido por Brackette e colaboradores (Iritani and Niwa, 1977; Brackett *et al.*, 1982).

A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) elaborou, em 1987, um manual com todos os procedimentos necessários para a preparação de embriões e a sua movimentação internacional, o qual é ainda um guião mundial utilizado para a produção e transferência de embriões. Os últimos dados publicados por esta sociedade, referem-se ao ano de 2015, indicando que nesse ano, a nível mundial, foram efetuadas um total de 100739 lavagens, das quais resultaram 660221 embriões transferíveis. Relativamente à produção de embriões *in vitro*, foram produzidos nesse mesmo ano um total de 23637 embriões de bovino viáveis, dos quais 49,8% foram transferidos em fresco e o resto congelados (Stringfellow and Seidel, 2007; Perry, 2016).

1.1. Aplicações e limitações de FIV

Em 1996 Guerin e colaboradores definiram a FIV como sendo uma técnica de reprodução assistida que permite a incubação de gâmetas femininos e masculinos, em meios que lhes fornecem os elementos necessários para a maturação final, fusão e capacidade de suportar os primeiros estádios de desenvolvimento embrionário. Esta técnica tem sido usada tanto na área humana como na área animal. Assim, o crescente interesse pela fertilização *in vitro* foi acentuado, continuando até aos dias de hoje. Tal acontecimento deve-se ao facto desta matéria ter uma importância mundial, não só a nível humano, mas também na pecuária, e particularmente o caso da espécie bovina (Guerin *et al.*, 1996).

Entre as diversas aplicações da FIV, podem ser destacadas como principais o facto de aumentar o potencial de fêmeas de alto valor genético, bem como a utilização de animais que estariam condenados ao abate pela sua incapacidade de produzir descendência, tal como a possibilidade de produção de um maior número de crias num menor intervalo de tempo (Bueno and Beltran, 2008). A possibilidade de se obter descendência de fêmeas após a puberdade, sendo os ovócitos recolhidos por punção via vagina (*ovum pick-up* – OPU) não sendo necessário esperar que a fêmea atinja o tamanho e peso necessário para a primeira cobertura, é mais uma aplicação valiosa da fertilização *in vitro*. Assim o material genético

destes animais pode ser transmitido à geração seguinte, precocemente, sem interferir com a vida reprodutiva e produtiva normal do animal. Por outro lado, temos ainda a vantagem da FIV atuar como uma medida preventiva no que diz respeito à transmissão de doenças entre os animais durante a cópula (Lohuis, 1995).

Estas vantagens, entre outras, permitem diminuir o intervalo entre gerações e obter num menor intervalo de tempo uma seleção e uma maior descendência, representando uma mais valia para a indústria bovina. No entanto a fertilização *in vitro* possui também aspetos nefastos para o sector animal, nomeadamente o facto da rápida disseminação de determinados genes, que é uma consequência da seleção rápida e aprofundada, que pode vir a prejudicar a variabilidade genética de muitas espécies, incluído a bovina (van Wagtendonk-de Leeuw, 2006). Para além disso, tem como desvantagem os custos associados bem como uma maior suscetibilidade dos embriões produzidos *in vitro* à criopreservação (Hamada *et al.*, 2000).