
**SENSIBILIDADE DE RAÇAS NACIONAIS BOVINAS AO
SÍNDROMA DE VITELOS PESADOS ASSOCIADO À PRODUÇÃO
DE EMBRIÕES *IN VITRO***

Programa de Investigação apresentado às provas para o Concurso de
Acesso à Categoria de Investigador Coordenador da Carreira de
Investigação Científica do INIA na Área de
“Fisiologia e Reprodução Animal”

António Eduardo Monteiro Horta

ESTAÇÃO ZOOTÉCNICA NACIONAL
VALE DE SANTARÉM
- 1999 -

ÍNDICE

Título e Resumo	3
1. Situação actual dos conhecimentos e estudos realizados	4
1.1. Introdução	4
1.2. Características do crescimento fetal	5
1.2.1. Factores hormonais e crescimento do feto	7
1.2.2. Controlo genético	8
1.3. Embriões IVP e crescimento fetal	9
1.3.1. Efeito da técnica IVP no crescimento fetal e peso ao nascimento	9
1.3.2. Progesterona	11
1.3.3. Lactogénio placentário	13
1.3.4. Insulina	13
1.3.5. Proteínas placentárias	14
1.4. Outros factores associados ao aumento do peso ao nascimento de vitelos IVP	15
1.5. Conclusões	18
2. Programa de investigação	19
2.1. Introdução	19
2.2. Projecto 1: Avaliação do efeito de diferentes tipos celulares em co-cultura e da progesterona no crescimento embrionário <i>in vitro</i> .	20
2.2.1. Objectivos e Delineamento	20
2.2.2. Metodologia	23
2.3. Projecto 2: Susceptibilidade de raças nacionais ao efeito da progesterona e da técnica IVP sobre o crescimento embrionário e fetal, dificuldade ao parto e crescimento pós-natal	27
2.3.1. Objectivos	27
2.3.2. Estudo 1: Efeito da progesterona e da co-cultura celular sobre o crescimento embrionário <i>in vitro</i> em raças autóctones.	28
2.3.3. Estudo 2: Caracterização do crescimento fetal, dificuldade ao parto e crescimento pós-natal em raças portuguesas, utilizando embriões IVP	30
2.4. Projecto 3: Influência da técnica de produção de embriões (IVP, IA e MOET) e da progesterona sobre o desenvolvimento do feto, peso ao nascimento e crescimento pós-natal em duas raças autóctones.	33
2.4.1. Modelo estatístico	34
2.4.2. Metodologia específica.	35



2.5. Protocolo de base para a produção de embriões <i>in vitro</i> (protocolos utilizados no Departamento de Reprodução da EZN; extraído de Marques, 1998)	38
2.5.1. Colheita dos ovários.	38
2.5.2. Aspiração dos oócitos.	38
2.5.3. Maturação dos oócitos primários	39
2.5.4. Capacitação <i>in vitro</i> do sémen bovino	40
2.5.5. Fertilização <i>in vitro</i>	41
2.5.6. Cultura de embriões <i>in vitro</i>	42
2.5.6.1. Preparação das monocamadas de células da granulosa	43
2.5.7. Técnica de coloração vital e nuclear de blastócitos por epifluorescência (método baseado no de Purcel <i>et al.</i> , 1985 e modificado por Yang Zhihong, gentilmente cedido pelo Prof. Raymond Wright)	44
2.6. Doseamentos radioimunológicos (RIA)	45
2.6.1. Progesterona	45
2.6.2. bPSPB	45
2.6.3. Lactogénio placentário bovino (bPL)	45
2.7. Medições ecográficas do feto	46
3. Meios necessários	47
3.1. Equipamento	47
3.2. Material descartável	48
3.3. Animais, embriões e calendarização	49
3.4. Meios humanos	51
3.5. Encargos financeiros	52
4. Considerações finais	54
5. Referências Bibliográficas	55
ANEXOS	60

**SENSIBILIDADE DE RAÇAS NACIONAIS BOVINAS AO SÍNDROMA DE
VITELOS PESADOS ASSOCIADO À PRODUÇÃO DE EMBRIÕES
IN VITRO.**

RESUMO

É analisada a ocorrência do nascimento de vitelos significativamente mais pesados do que a média, associada à técnica de produção *in vitro* de embriões (IVP). Dos trabalhos publicados em bovinos e ovinos pode-se inferir que existe influência da técnica IVP sobre o crescimento do feto durante a gestação e conseqüente peso ao nascimento. Contudo, nem todos os resultados são coincidentes relativamente à quantificação do problema em termos de desvio à normalidade. Se os primeiros trabalhos não conseguiram separar o efeito do genótipo do da técnica, trabalhos mais recentes levam-nos a concluir que parece existir uma interação entre aqueles dois factores. Assim, nas raças grandes e nos cruzamentos indiscriminados em bovinos, podem aparecer desvios à média superiores a 9 kg, enquanto que em raças pequenas esse desvio se situa à volta de 2 kg. Em termos práticos esta informação é importante visto que as distócias e a sobrevivência dos recém-nascidos, além de estarem altamente correlacionadas entre si, são ambas influenciadas pelo peso do vitelo ao parto.

Face aos conhecimentos existentes, propõe-se um programa de investigação visando contribuir para a compreensão do processo, possíveis causas e factores a ele associados. A ausência de estudos que caracterizem e avaliem os riscos da transferência de embriões produzidos *in vitro*, pode pôr em causa a expansão da utilização desta técnica pelo seu alto grau de imprevisibilidade relativamente à sobrevivência das mães e recém-nascidos.

Neste programa prevêem-se acções que identifiquem factores que durante as várias etapas de produção *in vitro* possam estimular precocemente o desenvolvimento do embrião e do feto durante a gestação. Entre eles é proposto o estudo da influência da progesterona no crescimento embrionário precoce, a caracterização deste efeito em duas raças nacionais e a sua relação com alterações hormonais e crescimento fetal ocorridos durante a gestação, dificuldades ao parto e crescimento dos vitelos. Propõe-se igualmente estudar a sensibilidade das raças *Mertolenga* e *Alentejana* ao síndrome dos vitelos pesados usando embriões IVP.

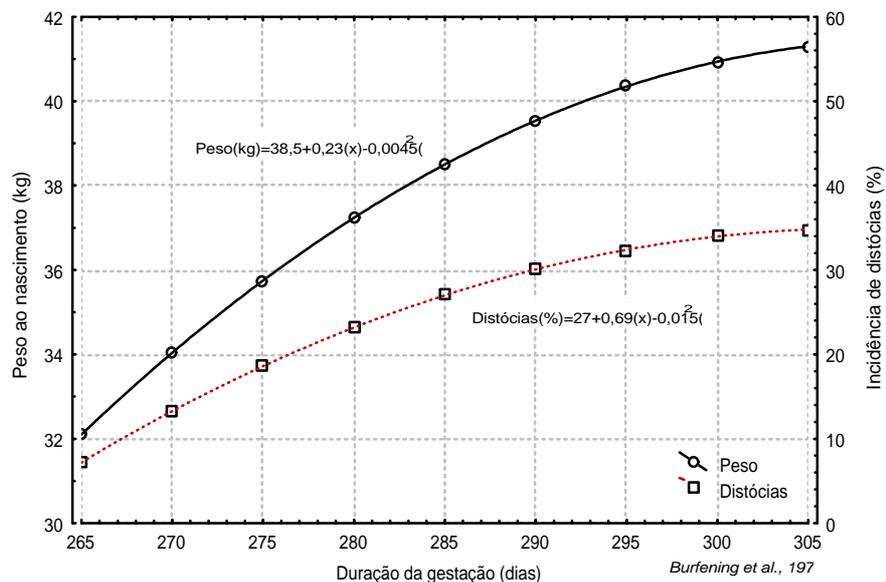
1. Situação actual dos conhecimentos e estudos realizados

1.1. Introdução

Os sistemas de cultura *in vitro* de embriões bovinos já fazem parte da indústria de transferência de embriões. Estes sistemas são utilizados para produzir com sucesso um grande número de embriões para a transferência comercial e para trabalhos de investigação. A aplicação prática da técnica de transferência de embriões produzidos *in vitro* depende do grau de sucesso da operação relativamente aos objectivos pretendidos.

Em 1992 foi pela primeira vez apresentado publicamente à comunidade científica o problema do nascimento de vitelos pesados em associação com a técnica de transferência de embriões totalmente produzidos *in vitro* (IVP), resultando de cruzamentos aleatórios entre raças (Horta *et al.*, 1992). Neste trabalho foi patente uma elevada mortalidade ao parto (26,7%) à qual estiveram associados o aumento do peso ao nascimento e gestações mais prolongadas.

Figura 1. Incidência de distócias e pesos ao nascimento em função da duração da gestação na raça *Simental* (adaptado de Burfening *et al.*, 1978).



Na raça *Simental* e utilizando a fertilização *in vivo*, verificou-se que por cada dia acima da média da gestação para a raça os vitelos nascem mais pesados 0,5 kg e que a taxa de assistência ao parto aumenta 1% (Figura 1, Burfening *et al.*, 1978). Com os embriões IVP resultantes de cruzamentos indiscriminados, verificou-se que por cada dia de gestação entre os 265 e 298 dias os vitelos nasciam mais pesados 0,764 kg (Figura 2, Horta *et al.*, 1992, 1993). Neste trabalho conseguiu-se contrariar

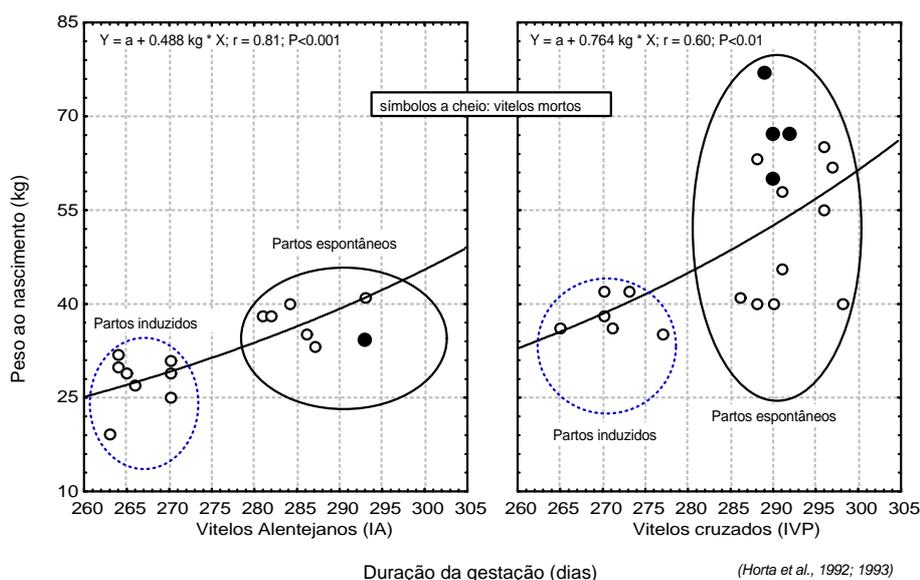
o aumento do peso através da indução dos partos entre os 265 e 270 dias de gestação (Tabela 1).

Tabela 1 - Diferenças nos pesos ao nascimento entre gemelares (Gem) e singulares (Sing), em partos espontâneos (PE) ou induzidos (PI) e com produtos IA ou IVP (Horta *et al.*, 1992, 1993).

		(n)	Média (Kg)	Interv. de Conf. das médias (LSD)		Signif.*	Mortalidade ao parto (%)
Produtos IA:							
PE	Sing	8	38,5	33,9	43,1	a	12,5
	Gem	12	32,3	28,6	36,1	b	0,0
PI	Sing	8	27,8	24,5	31,0	c	0,0
	Gem	5	23,4	19,3	27,5	d	0,0
Produtos IVP:							
PE	Sing	15	54,4	51,6	57,2	e	26,7
	Gem	18	43,4	40,8	46,0	f	27,8
PI	Sing	5	38,8	33,9	43,7	a	0,0
	Gem	3	37,0	30,7	43,3	a	0,0

* Para os pesos, letras diferentes indicam médias significativamente diferentes (ANOVA-LSD; $P < 0,001$).

Figura 2. Peso ao nascimento de vitelos singulares Alentejanos (IA) ou cruzados (IVP) em função da duração da gestação. Efeito da indução dos partos (adaptado de Horta *et al.*, 1992; 1993).



1.2. Características do crescimento fetal

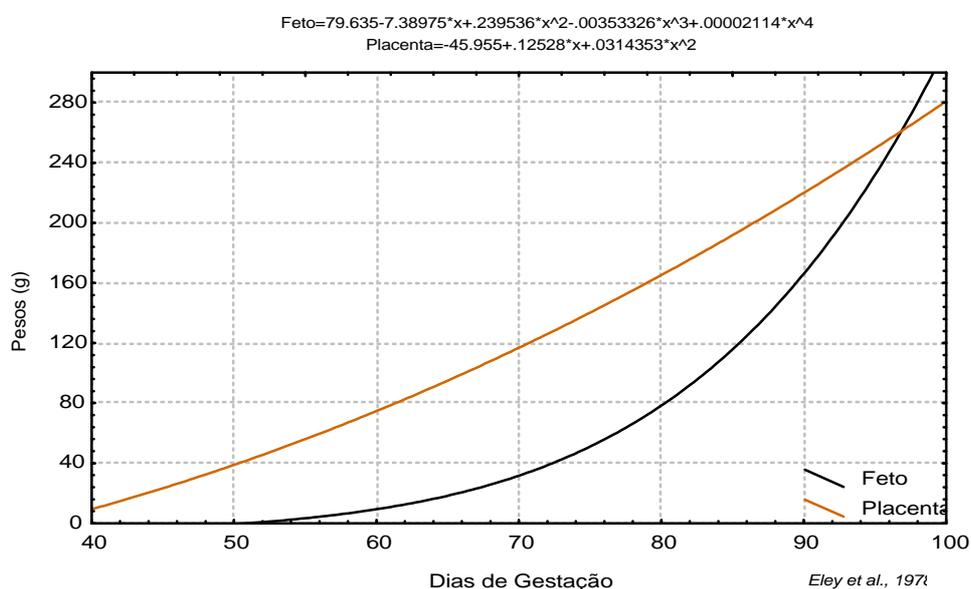
De acordo com o trabalho de Eley *et al.* (1978) realizado em 254 fetos (4 raças puras e fetos cruzados), verifica-se o seguinte padrão de crescimento do feto bovino:

- Nos primeiros 100 dias de gestação os aumentos do volume do líquido alantoideo e do peso da membrana cório-alantóide precedem os do peso fetal, do peso da membrana amnio-alantóide, e volume do líquido amniótico.

Diferentes taxas de crescimento relativo das diversas estruturas fetais sugerem que a expansão da membrana cório-alantóide é um pré-requisito para o futuro crescimento fetal (Figura 3).

- Os fetos masculinos são significativamente mais pesados que os femininos a partir dos 100 dias de gestação (Figura 4).
- A taxa máxima de crescimento em todos os fetos verifica-se aos 230 dias de gestação atingindo valores superiores a 200 g/dia. Este crescimento declina para menos de 100 g/dia por ocasião do parto.

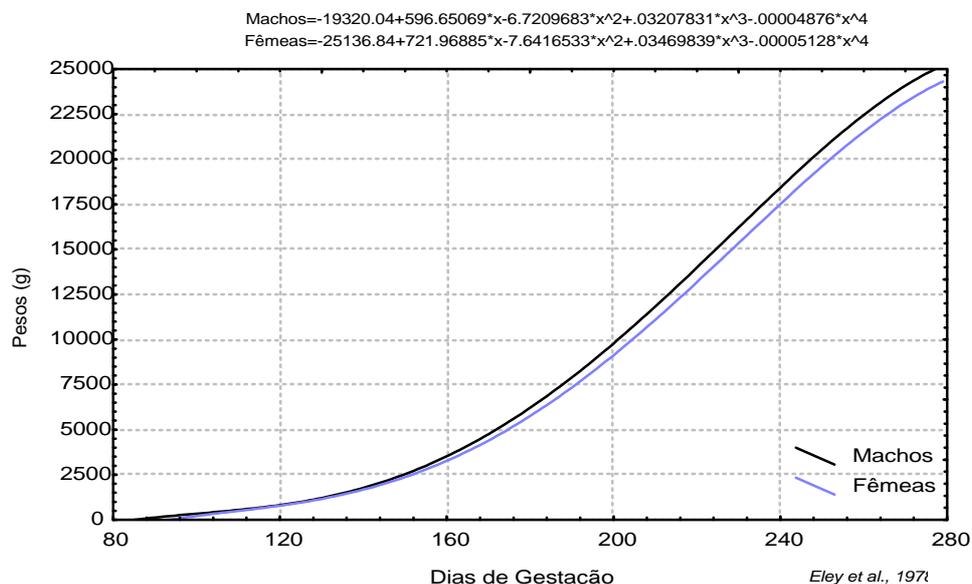
Figura 3. Evolução ponderal do feto e da placenta até aos 100 dias de gestação (adaptado de Eley *et al.*, 1978).



Para Prior e Laster (1979), o crescimento dos fetos bovinos obedece a um padrão sigmóide com uma taxa de crescimento máxima aos 232 dias de gestação (350 g/dia). Este crescimento contrasta com o observado antes dos 120 dias, onde a taxa de crescimento fetal é aproximadamente igual a 25 g/dia.

Por outro lado, Gore *et al.* (1994) concluem que o desenvolvimento do músculo fetal nos primeiros 100 dias de gestação está relacionado com os padrões de desenvolvimento pós-natal, e que esta relação passa por características hiperplásicas musculares fetais. Estes autores verificaram que as características fenotípicas do crescimento muscular fetal dependem do genótipo, e que esta relação varia de acordo com o estadio de gestação. Estes resultados são importantes pois alertam para o problema da influência do genótipo sempre que se pretendam realizar estudos que examinem os mecanismos de crescimento e desenvolvimento embrionário.

Figura 4. Evolução de fetos masculinos e femininos acima dos 100 dias de gestação (adaptado de Eley *et al.*, 1978).



1.2.1. Factores hormonais e crescimento do feto

A placenta desempenha um papel muito crítico ao fornecer um ambiente que permita o crescimento do feto em condições óptimas. Ela fá-lo por se constituir como o local de trocas de nutrientes da mãe para o feto, por ser o local onde os produtos resultantes do metabolismo fetal são excretados para a circulação materna, por actuar como uma barreira contra os agentes patogénicos e o próprio sistema imunitário materno, e por ser um órgão endócrino activo capaz de segregar hormonas, factores de crescimento, citocinas e outros produtos bioactivos.

Entre as hormonas produzidas pela placenta encontram-se as pertencentes à família genética da hormona do crescimento/prolactina como os lactogénios placentários (**PL**) e as proteínas relacionadas com a prolactina. Embora as funções exactas dos membros placentários da família deste gene não tenham sido inteiramente elucidadas, os conhecimentos disponíveis atribuem um papel para alguns deles na modulação do metabolismo materno e fetal.

Os lactogénios placentários, que são segregados para as circulações materna e fetal, pelo menos nos ruminantes parecem mediar os seus efeitos através de receptores específicos, embora este aspecto permaneça ainda controverso. Além de afinidades aos seus próprios receptores (endométrio), o **bPL** liga-se e compete com

os receptores da **bGH** e da **bPRL** (fígado e corpo lúteo) (Anthony *et al.*, 1995). Patel *et al.* (1996) verificaram que as concentrações maternas de **bPL** estão significativamente associadas ao estadió da gestação. Elas permanecem baixas durante os dois primeiros trimestres para aumentarem de forma abrupta entre os 200 e 220 dias, mantendo-se estabilizadas até ao parto. Estes autores verificaram ainda que o peso do feto ao parto e a lactação subsequente estão significativamente correlacionados com as concentrações de **bPL** e que estas podem ser utilizadas como um índice valioso na previsão da viabilidade feto-placentária.

Uma das acções do **PL** parece prender-se com a modulação da produção de **IGF** (*Insulin-like growth factors*) fetal. Experiências em ratinhos, utilizando técnicas de ablação de genes, demonstram a importância dos **IGF** na manutenção crescimento normal do feto (DeChiara *et al.*, 1990, 1991; Baker *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1993). No seu conjunto, estas experiências demonstram a importância do **IGF-I** e **IGF-II** para o normal crescimento do feto e a cronologia relativa das suas influências. Elas indicam que parece existir um terceiro receptor celular (além do **IGF1R** e **IGF2R**) através do qual actua o **IGF-II**. Em várias espécies foi igualmente confirmada uma acção luteotrófica para o **PL** (roedores, ruminantes).

1.2.2. Controlo genético

Os estudos do efeito da técnica IVP sobre o crescimento fetal e consequente peso ao parto deverão ter em conta os factores ligados ao genótipo. O crescimento do feto no útero é primariamente controlado pelo genótipo fetal (Ferrell, 1991) sendo influenciado por outros factores que incluem a raça, o sexo do feto, o número de fetos no útero, e o ambiente materno uterino (Eley *et al.*, 1978; Anthony *et al.*, 1986; Echternkamp, 1992; Gore *et al.*, 1994). O peso da placenta é influenciado pela raça da fêmea incubadora e do feto (Ferrell, 1991) e pelo número de fetos presentes no útero (Echternkamp, 1992).

O crescimento exagerado do feto no útero parece estar associado com uma mutação do gene **H19**, segundo estudos realizados no rato (Leighton *et al.*, 1995). Este gene não codifica nenhuma proteína funcional, mas está adjacente ao gene que codifica o **IGF-II**. A expressão do gene **H19** ocorre coincidentemente com a eliminação da transcrição de **IGF-II**, reduzindo em consequência a produção de **mRNA** do **IGF-II** (Leighton *et al.*, 1996). O “knockout” genético do *locus* materno

H19 no rato está associado com um aumento de 27% no peso dos fetos ao nascimento.

Estudos realizados na ovelha mostram que, embora o gene da **IGF-II** seja similar ao dos humanos (na ovelha não é transcrito o exon 2 equivalente aos humanos), existem diferenças quanto ao padrão da expressão da transcrição do gene entre estas espécies (Young et al., 1997). Com efeito, detectaram-se diferenças na produção de transcrições deste gene entre o feto e o adulto e entre espécies. Na ovelha e na vaca pouco se conhece ainda sobre a impressão das transcrições deste gene, as quais variam com o tipo de tecido e com a fase de desenvolvimento do animal (Young et al., 1997). É possível que alterações na expressão das transcrições deste gene quer quantitativas, qualitativas ou temporais possam estar na origem de nascituros mais pesados nas espécies pecuárias.

Embora os elementos placentários da família do gene da hormona do crescimento/prolactina não tenham sido identificados em todas as espécies domésticas, nos ruminantes eles desempenham sem dúvida um papel importante na manutenção da gestação. Estudos que esclareçam a forma como os lactogénios placentários e outras hormonas placentárias influenciam o crescimento e desenvolvimento fetais são essenciais para clarificarem este aspecto nas espécies pecuárias. Esta informação é necessária para compreendermos melhor a etiologia das distócias, mortalidade perinatal, e problemas de crescimento e desenvolvimento pós-natal.

1.3. Embriões IVP e crescimento fetal

1.3.1. Efeito da técnica IVP no crescimento fetal e peso ao nascimento

Inicialmente pensou-se que o nascimento de vitelos mais pesados estava associado somente a técnicas de manipulação nuclear utilizadas nalguns procedimentos de produção de embriões *in vitro* (Willadsen et al., 1991; Seidel, 1992; Keefer et al., 1994; Behboodi et al., 1995; Wilson et al., 1995).

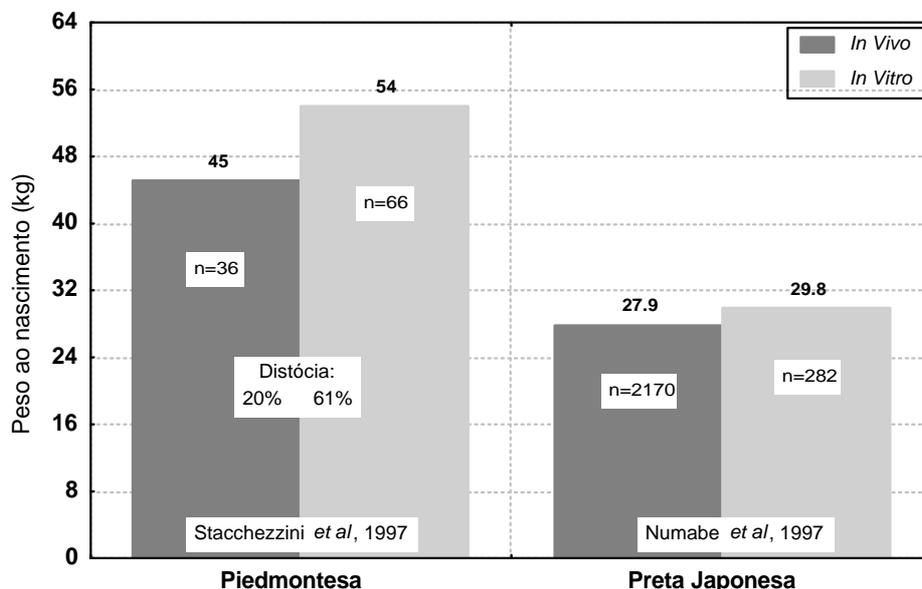
Hoje reconhece-se que um maior crescimento do feto durante a gestação acontece com embriões IVP não manipulados, quer nos bovinos (Horta et al., 1992; Farin e Farin, 1995; Sinclair et al., 1995; Hasler et al., 1995, Kruip e den Daas, 1997;

Stacchezzini *et al.*, 1997; Numabe *et al.*, 1997), quer em ovinos (Walker *et al.*, 1992).

Com exceção dos trabalhos em que os embriões foram produzidos por transferência nuclear, até 1997 nunca surgiram na literatura resultados que conseguissem separar os efeitos da heterose e da técnica IVP em relação ao nascimento de vitelos mais pesados. Com efeito, em todos eles havia um grau de cruzamento de raças ou de utilização de touros diferentes, que não permitiam inequivocamente implicar a técnica IVP por si só no aumento de peso dos vitelos.

Em 1997, são publicados os primeiros três trabalhos utilizando um delineamento susceptível de poder responder a esta questão (Stacchezzini *et al.*, 1997; Numabe *et al.*, 1997; Farin *et al.*, 1997a;b). Assim, trabalhando com a raça *Piedmontesa* em Itália, Stacchezzini *et al.* (1997) compararam os pesos de vitelos após transferência de embriões produzidos *in vivo* (MO) com os produzidos *in vitro* (IVP) e fertilizados com um touro da mesma raça. Neste trabalho verificou-se que os embriões IVP nasceram 9 kg mais pesados que os produzidos *in vivo* (54 vs 45 kg, $P < 0,05$, Figura 5), tendo resultado em consequência disso um aumento da incidência de distócias de 20 para 60%.

Figura 5. Efeito da técnica IVP sobre o peso dos vitelos ao nascimento em raças diferentes



Trabalhando com a raça *Preta Japonesa*, Numabe *et al.* (1997), e ao compararem vitelos IVP com os oriundos de inseminação artificial utilizando 2 touros da mesma raça, chegaram a conclusões semelhantes. Contudo, neste último trabalho a diferença dos pesos de vitelos IVP e IA ao nascimento foi somente de 1,9

kg (29,8 vs 27,9 kg, $P < 0,05$, Figura 5) não tendo daí resultado um aumento de incidência de partos distócicos.

Destes dois trabalhos podemos então concluir que existe um efeito directo da técnica IVP no aumento do peso dos vitelos ao nascimento, o qual parece igualmente interagir com o genótipo dos embriões: incremento de peso muito elevado nas raças grandes e quase desprezível nas raças pequenas. Do ponto de vista prático, a ausência de distócias nas raças pequenas indica que a técnica IVP pode ser utilizada sem inconvenientes relativamente ao bem estar dos animais.

Um efeito directo da clonagem é evidente quando embriões clonados que não passaram por processos de maturação ou cultura *in vitro* (produzidos a partir de oócitos maturados *in vivo*, utilizando núcleos de blastómeros retirados de embriões produzidos *in vivo* e posteriormente cultivados no oviducto de ovelhas), originam vitelos mais pesados ao nascimento (machos: 48,6 vs 40,2 kg, fêmeas: 47,8 vs 37,8 kg; Wilson *et al.*, 1995).

Resta saber ainda, além do genótipo, que factores associados à técnica IVP ou à clonagem induzem tão precocemente no embrião alterações que aceleram o seu crescimento no útero. Farin *et al.* (1997b), embora utilizando um pequeno número de animais mas anulando o efeito do genótipo (raça holstein e usando o mesmo touro na FIV), não encontraram diferenças no peso e dimensões da placenta e dos fetos produzidos *in vivo* ou *in vitro*.

1.3.2. Progesterona

A progesterona parece estar implicada num efeito precoce sobre o embrião, levando-o a crescer mais rapidamente durante a gestação. Embriões ovinos recolhidos após superovulação aos 3 dias de idade, foram transferidos assincronamente para ovelhas no 6º dia do ciclo (sendo assim precocemente expostos a concentrações elevadas de progesterona) e retransferidos depois para ovelhas síncronas com a idade do embrião. Em consequência resultaram fetos significativamente maiores ao 37º dia de gestação (Wilmut e Sales, 1981). Num estudo comparável, foi observado que logo aos 21 dias de idade, existe um aumento de 42% no peso dos embriões sujeitos àquela metodologia (Young *et al.*, 1995).

Quando a transferência assíncrona anteriormente referida é substituída pela administração de progesterona às receptoras de embriões produzidos por superovulação, verifica-se igualmente um aumento do crescimento fetal na ovelha. A administração de P4 a ovelhas entre os dias 1-6 após a ovulação provocou um aumento de 12% no crescimento fetal ao 74º dia de gestação (Kleemann *et al.*, 1994). Na vaca, a administração de progesterona 1-6 dias após a inseminação artificial provoca um aumento significativo no comprimento do embrião ao 14º dia de idade (Garrett *et al.*, 1988). O mecanismo preciso pelo qual a suplementação com progesterona às fêmeas no início da gestação influencia o crescimento embrionário e fetal não é claro, mas é provável que envolva uma acção indirecta através de alterações provocadas nas secreções do oviducto e/ou uterinas maternas (Garrett *et al.*, 1988).

De acordo com estudos não publicados e referidos por Walker *et al.* (1996) o efeito da progesterona parece estar associado a uma alteração da distribuição das células no embrião, favorecendo um aumento das da trofoectoderme (placenta) em relação às da massa celular interior (feto).

Uma acção directa da progesterona sobre embriões IVP ainda não foi demonstrada, mas estudos realizados na EZN indicam que não é de excluir esta hipótese (Pereira *et al.*, 1997, Vasques *et al.*, 1998). Com efeito, a utilização de meios de cultura que aumentam por si só a produção de progesterona pelas células da granulosa co-cultivadas com embriões *in vitro*, provocam uma aceleração significativa no crescimento de embriões logo aos 7 dias de idade (Pereira *et al.*, 1997). Sistemas IVP de embriões utilizando diferentes tipos de células em co-cultura, não especializadas na produção de progesterona, aparecem associados ao nascimento de vitelos mais pesados (Behoodi *et al.*, 1995; Farin e Farin, 1995; Hasler *et al.*, 1995), excluindo assim a hipótese da progesterona ser um factor comum na expressão daquele efeito. Contudo, o estudo do crescimento embrionário *in vitro* sob o efeito da progesterona pode vir a ser utilizado como um indicador do crescimento embrionário e permitir assim caracterizar a sensibilidade de diferentes genótipos à influência da técnica.

1.3.3. Lactogénio placentário

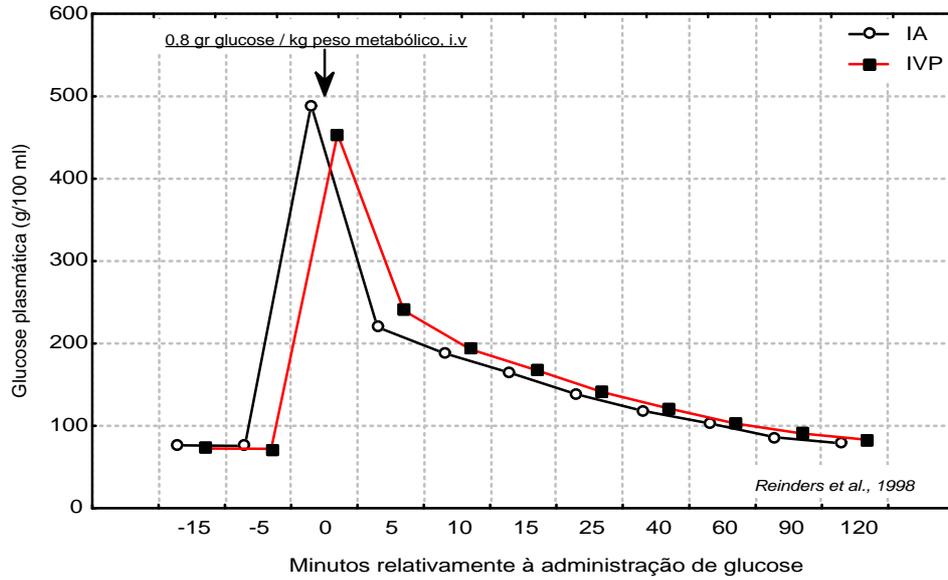
A produção de **PL** nunca foi estudada em gestações associadas à técnica IVP. O único trabalho que abordou indirectamente a acção do **PL** através do doseamento do **IGF-I** fetal, não encontrou diferenças nas concentrações de **IGF-I mRNA** em fígados de fetos bovinos originados por técnicas *in vitro* ou *in vivo*, aos 70 dias de gestação (Farin *et al.*, 1997a). Estes autores encontraram uma elevada correlação entre o peso corporal e o peso hepático do feto. Não existem estudos referentes à produção de **IGF-II** por parte de fetos originados por técnicas IVP.

1.3.4. Insulina

Mulheres hipoinsulinémicas parem fetos mais leves que o normal, enquanto que as hiperinsulinémicas dão à luz crianças mais pesadas (Gluckman, 1986). Em ratinhos, foi demonstrado que o knockout do locus genético regulador do substracto dos receptores à insulina e à **IGF-I**, provoca um atraso no desenvolvimento dos fetos e do seu crescimento pós-natal (Tamemoto *et al.*, 1994). Os ratinhos assim modificados mostraram igualmente uma maior resistência aos efeitos de diminuição das concentrações de glicose na dependência da insulina, **IGF-I** e **IGF-II** (teste de tolerância à glicose - GTT).

É interessante notar que à nascença, os níveis circulantes de insulina em vitelos originados a partir de embriões sujeitos a transferência nuclear, são três a seis vezes superiores às dos vitelos produzidos *in vivo*, situação que se mantém até 60 minutos após o parto (Garry *et al.*, 1996). Contudo, Reinders *et al.* (1998), não conseguiram evidenciar qualquer relação entre o síndrome de vitelos pesados e a viabilidade pós-natal com o desenvolvimento da diabetes de gestação tipo II (pelo teste de tolerância à glicose - GTT - das vacas gestantes, Figura 6), quer em vacas receptoras de embriões IVP quer em vacas inseminadas. Neste trabalho a média dos pesos ao nascimento não foi estatisticamente diferente entre vitelos oriundos de IA ou de IVP (43,4 vs. 42,7 kg, respectivamente), o que pode explicar a semelhança da resposta ao GTT. Os níveis de glucose dos recém nascidos antes da ingestão do colostro não foi diferente entre os dois grupos de vitelos.

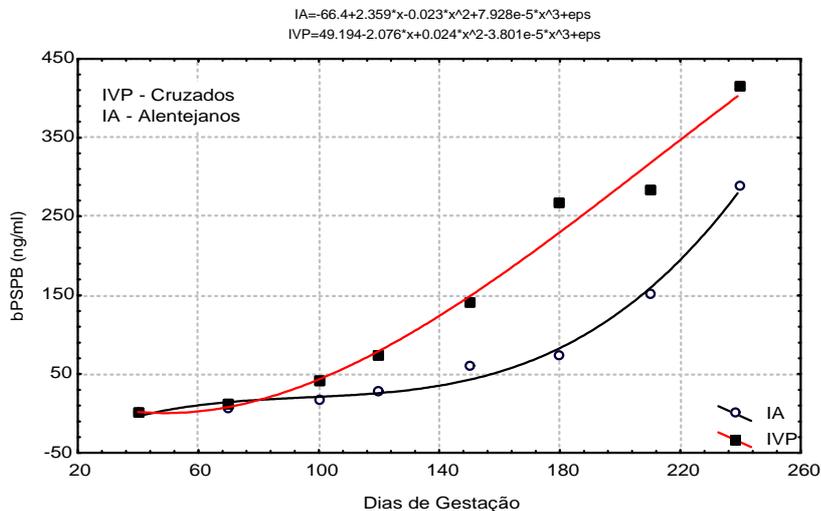
Figura 6. Teste de tolerância à glucose (GTT) em vacas gestantes com fetos originados de IA ou de embriões IVP. Concentrações de glucose corrigidas para o sexo do vitelo e o peso das vacas (Reinders *et al.*, 1998).



1.3.5. Proteínas placentárias

Em gestações originando vitelos singulares IVP mais pesados (cruzados) comparativamente a vitelos mais leves resultantes de inseminação artificial (*Alentejanos*), verifica-se um aumento significativo das concentrações de **bPSPB** ao longo da gestação (Figura 7, Vasques *et al.*, 1995). No mesmo ano, Patel *et al.* (1995) encontraram uma correlação significativa e positiva entre os teores de **bPSPB** em gestações singulares IVP com o peso dos vitelos ao nascimento. No ano seguinte, verificou-se que o aumento da **bPAG** antes do parto está significativamente correlacionada com o peso dos vitelos ao nascimento (Schmidt *et al.*, 1996).

Figura 7. Concentrações periféricas de bPSPB em vacas *Alentejanas* durante gestações singulares de fetos IVP cruzados e fetos IA *Alentejanos* (adaptado de Vasques *et al.*, 1995).



É provável que esta relação entre produção da **bPSPB** e da **bPAG** pelas células binucleadas da placenta e o peso dos vitelos seja somente um reflexo do aumento da actividade metabólica da placenta associada ao maior crescimento do feto e massas fetais, visto não se lhes conhecer até ao presente nenhuma actividade fisiológica identificada com a dos factores de crescimento.

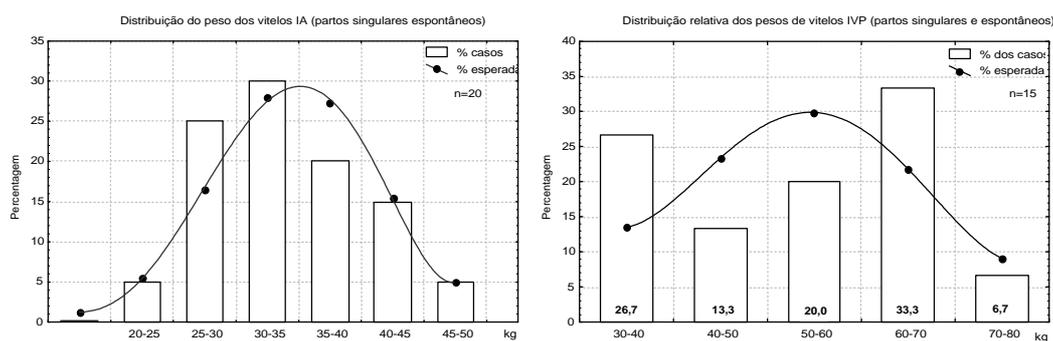
1.4. Outros factores associados ao aumento do peso ao nascimento de vitelos IVP

A transferência de embriões IVP em ovinos, resultou em aumentos significativos do peso ao nascimento, duração da gestação, incidência de distócias e nado-mortalidade quando comparada com grupos controlo (Walker *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1992; Holm *et al.*, 1994). Na vaca, existe também evidência de um aumento da duração da gestação e do peso dos vitelos associados à transferência de embriões IVP (Horta *et al.*, 1992, 1993; Sinclair *et al.*, 1995; Merton *et al.*, 1988). O único relato em bovinos em que não foi observado aumento da duração da gestação associado a pesos ao nascimento mais elevados aparece no trabalho de Behboodi *et al.* (1992). Neste trabalho os embriões foram manipulados (transferência nuclear), contrariamente aos anteriores.

A prova de que existe esta relação positiva entre o aumento do peso ao nascimento e a duração da gestação é evidenciada por Horta *et al.* (1992, 1993). Neste trabalho foi possível prevenir o nascimento de fetos mais pesados através da indução do parto cerca dos 268 dias de gestação, assim como anular a mortalidade dos vitelos ao parto (Tabela 1, Figura 2).

Na figura 8 pode observar-se que a distribuição dos pesos ao nascimento de vitelos IVP cruzados não é normal, contrariamente à dos produzidos por IA. Existe um aumento da percentagem de nascituros nas classes dos 30-40 kg e dos 60-70 kg, sugerindo que além de vitelos mais pesados existe também a possibilidade de nascerem vitelos mais leves associados à técnica IVP. Porém esta hipótese tem de ser confirmada visto que o exemplo dado foi obtido de um estudo na EZN utilizando vitelos IVP fruto de cruzamentos não controlados.

Figura 8. Distribuição dos pesos ao nascimento de vitelos IA (raça pura) e IVP (cruzamento de raças)



Merton *et al.* (1998) estudaram os **factores que influenciam** o peso ao nascimento em 607 vitelos produzidos pela técnica IVP. Entre eles, a pluriparidade da receptora, vitelos masculinos, os embriões de inferior qualidade, a congelação/dcongelação do embrião, gestações superiores a 275 dias, e os nados-mortos ou inviáveis até às 24 horas, foram factores que apareceram significativamente associados ao aumento do peso (Tabela 2). Além destes factores, a exploração pecuária, a fêmea dadora de oócitos e o touro utilizado na fertilização *in vitro*, afectaram significativamente o peso dos vitelos. Entre os factores directamente associados com a técnica de produção dos embriões, conclui-se deste trabalho que embriões frescos e de elevada qualidade originam vitelos menos pesados ao nascimento.

Tabela 2. Factores significativamente associados ao aumento do peso de vitelos IVP ao nascimento (Merton *et al.*, 1998).

Factor	Aumento de peso (kg)
Vacas vs. Novilhas	+ 2,6
Machos vs. Fêmeas	+ 1,2
Embriões grau 2 vs. grau 1	+ 1,2
Embriões congelados vs. frescos	+ 1,2
Duração da gestação superior a 275d	+ 2,4 a 10,7
Vitelos nados-mortos ou inviáveis às 24h pp vs. viáveis	+ 3,0
Dadoras, touro, modo de exploração das receptoras	(P<0,05)

No mesmo estudo, entre os **factores não correlacionados** com o peso ao nascimento encontram-se o sincronismo receptora/embrião (± 1 dia), a idade da receptora, a repetibilidade e intervalo entre as sessões de colheita de oócitos (OPU), a percentagem de cumulus-oócitos de boa qualidade, a utilização de células BRL em co-cultura, o estadio do embrião, o mês de parição, a raça da receptora, a equipa de transferência dos embriões, a qualidade da receptora e a duração do transporte do embrião entre o laboratório e o local de transferência.

Neste estudo foram assim identificados factores ao nível do oócito (dadora), do embrião (touro, qualidade, criopreservação), do vitelo (duração da gestação, sexo e viabilidade perinatal), bem como factores externos (exploração) que afectam significativamente o peso ao nascimento de vitelos IVP.

Alguns trabalhos levaram a pensar que a co-cultura de embriões com outras células poderia estar associada ao aumento do peso dos vitelos ao nascimento (Behoodi *et al.*, 1995; Farin e Farin, 1995; Hasler *et al.*, 1995). Na ovelha foi confirmada esta associação entre o desenvolvimento fetal e a presença de células da granulosa em co-cultura (Maxfield *et al.*, 1997). Neste trabalho, o aumento do peso dos fetos com 61 dias de gestação encontrado no grupo da co-cultura, apareceu associado a uma hipertrofia das fibras musculares primárias e hiperplasia das fibras musculares secundárias. Contudo, no recente trabalho de Numabe *et al.* (1999) que utilizou uma metodologia apropriada para o efeito, verificou-se que o aumento do peso de vitelos da raça Preta Japonesa não foi influenciada pela co-cultura com células da granulosa (Tabela 3).

Tabela 3. Peso ao nascimento e duração da gestação de vitelos IVP e IA (Numabe *et al.* 1999)

Grupo	Vitelos (n)	Peso ao Nasc.	Dur. Gest.	Touro	Vitelos (n)	Peso ao Nasc.	Dur. Gest.
IVP com Co-cultura	307	30.0 a	288.8 a	A	97	30.3 ab	291.3 a
				B	210	29.7 b	285.2 c
IVP sem Co-cultura	41	31.0 a	289.2 a	A	21	32.0 a	292.2 a
				B	20	30.0 abc	286.2 bc
IA	1493	27.8 b	286.6 b	A	1211	27.3 d	286.0 c
				B	282	28.2 c	287.2 b

1.5. Conclusões

A produção de embriões *in vitro* e a clonagem por transferência nuclear, são dois procedimentos tecnológicos susceptíveis de induzir alterações ao nível do jovem embrião que aceleram o seu crescimento no útero. Estudos realizados com o controlo do genótipo sugerem a existência de uma interacção entre a técnica e a raça no aparecimento de vitelos mais pesados ao nascimento. Em raças de pequeno porte o aumento de peso ao nascimento não chega a comprometer a viabilidade dos recém-nascidos. Nos cruzamentos indiscriminados e nas raças de grande porte, existe um aumento da incidência de distócias e mortalidade neo-natal associada ao aumento do peso dos vitelos e da duração da gestação. Nestes casos podem nascer vitelos com valores extremos da ordem dos 78 kg. Embriões produzidos *in vivo*, sujeitos a altas concentrações de progesterona no início do seu desenvolvimento, dão origem a placentas e fetos mais pesados. O seu mecanismo de acção a este nível é desconhecido, justificando-se a realização de estudos no sentido de verificar se *in vitro* também induz um crescimento acelerado nos embriões e no próprio feto. É postulado que este síndrome resulta de alterações provocadas no meio durante o desenvolvimento embrionário conduzindo a alterações da regulação precoce da expressão dos genes implicados na síntese dos factores tróficos. A produção de nascituros mais pesados pela utilização de técnicas de produção *in vitro* de embriões levanta pois novas questões e desafios sobre o papel destas tecnologias na reprodução animal e humana, justificando a realização de mais estudos no sentido de melhor esclarecer as causas do fenómeno, sua expressão e prevenção.

2. Programa de investigação

2.1. Introdução

Os conhecimentos actuais indiciam claramente a existência de uma interacção entre a técnica IVP e o genótipo do embrião na expressão do aumento do crescimento fetal associado àquela técnica.

Todas as células nucleadas contêm duas cópias completas do material genético (uma de origem paterna e a outra materna). O genoma é constituído por 30 cromossomas nos bovinos, 27 nos ovinos e 19 no suíno doméstico. Os conhecimentos actuais relativamente ao mapa genético dos bovinos estão ainda muito incompletos, o que impede a curto prazo a resolução deste problema concreto pela via transgénica.

Contudo, a identificação de factores presentes nas culturas *in vitro* que apareçam associados ao desenvolvimento do embrião e do feto permitirá adquirir conhecimentos que se poderão revelar úteis, quando mais tarde o conhecimento do mapa genético dos bovinos poder proporcionar uma manipulação preventiva ou correctora dos desvios encontrados.

Neste programa de investigação propõe-se estudar todo o período *in vitro* da produção de embriões bovinos com o objectivo de se detectarem influências do tipo de células em co-cultura e da suplementação com progesterona (P4), sobre a velocidade de crescimento embrionário até à fase de blastócito. Em seguida, será realizado o mesmo estudo mas tendo em vista a sua expressão na fase de crescimento fetal intrauterino, dificuldade ao parto e crescimento pós-natal, caracterizando-o em diferentes genótipos bovinos nacionais escolhidos de acordo com o peso vivo corporal atingido na fase adulta (raças de pequeno e de grande porte). Num terceiro projecto pretende-se comparar o efeito da técnica de produção de embriões *in vitro* vs. *in vivo* sobre o desenvolvimento do feto e peso ao nascimento em duas raças nacionais, quando os embriões são expostos ou não à influência da progesterona.

Desta forma, mesmo que a investigação dos diferentes factores considerados à partida como potencialmente associados ao síndrome dos vitelos grandes não se exprima de forma inequívoca, este programa permitirá em última instância caracterizar a sensibilidade dos diferentes genótipos a este síndrome. Esta informação permitirá no futuro a utilização daquelas raças onde, à semelhança da

raça Preta Japonesa, o efeito da técnica é desprezível relativamente às suas consequências indesejáveis na facilidade dos partos e na sobrevivência dos nascituros.

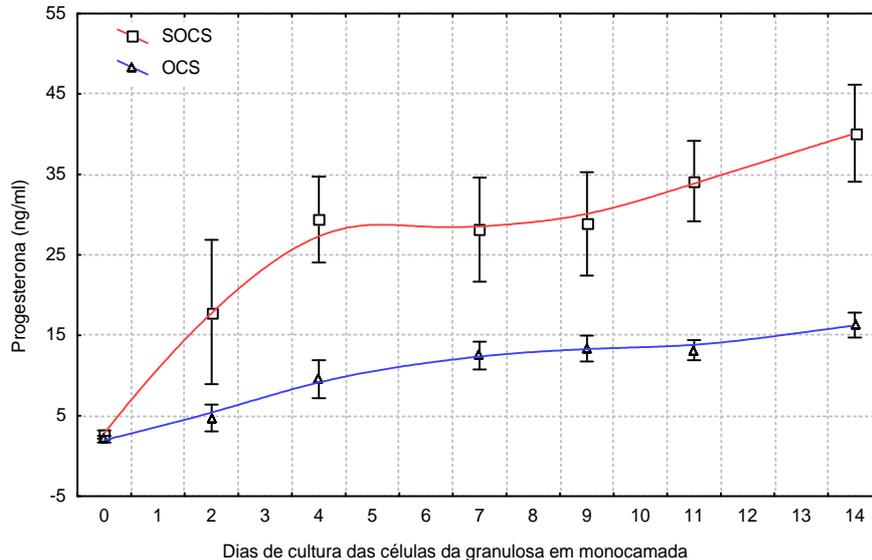
2.2. Projecto 1: Avaliação do efeito de diferentes tipos celulares em co-cultura e da progesterona no crescimento embrionário *in vitro*.

2.2.1. Objectivos e Delineamento

Face aos resultados obtidos *in vivo* em ovelhas e vacas referidos na revisão dos conhecimentos, é urgente confirmar se a progesterona exerce *in vitro* um efeito promotor do crescimento do embrião, tal como acontece *in vivo*.

Os resultados obtidos no nosso laboratório (Pereira et al., 1997, Vasques et al., 1998), mostraram que o soro de vacas superovuladas (SOCS) aumenta significativamente a síntese de progesterona pelas células da granulosa quando comparado com o soro de vaca em cio natural (OCS), (Figura 9).

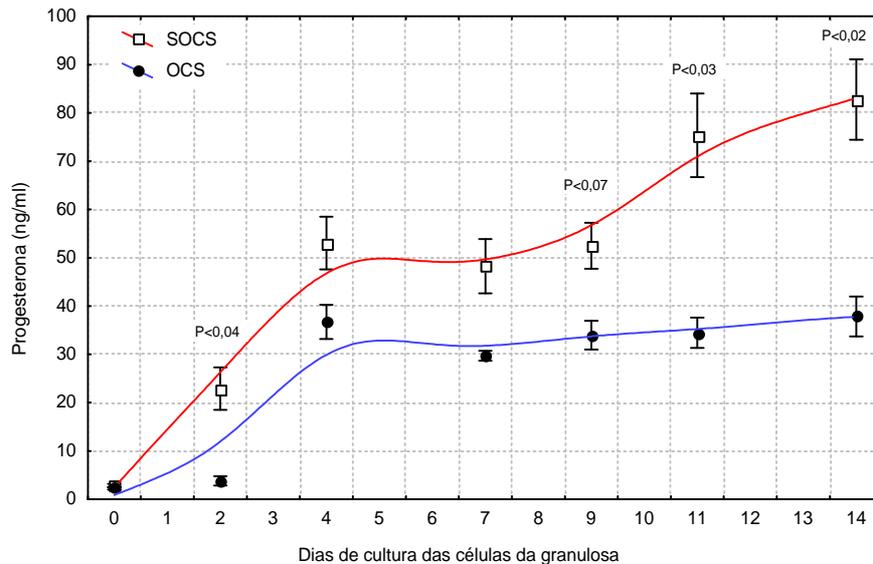
Figura 9. Efeito da suplementação com soro de vacas superovuladas (SOCS) ou em cio natural (OCS) na produção *in vitro* de progesterona pelas células da granulosa na ausência de embriões (média \pm ep, Pereira et al., 1997).



Este estímulo na produção de progesterona verifica-se tanto na ausência de embriões (Figura 9) como na sua presença (Figura 10), havendo em ambos os soros um acréscimo significativo na produção de progesterona quando em presença de embriões. Os embriões bovinos mesmo antes da eclosão produzem factores luteotróficos capazes de acelerar o processo de diferenciação das células da

granulosa *in vitro*. Este efeito, medido pela produção de progesterona pelas células da granulosa cultivadas em TCM199 e 10% de soro de vaca em cio superovulada (SOCS), acentua-se quando da passagem de blastócito expandido para eclodido (Vasques *et al.*, 1998).

Figura 10. Produção *in vitro* de progesterona por culturas de células da granulosa na presença de embriões (introduzidos ao 2º dia), em meios suplementados com soro de vaca em cio natural (OCS) ou após tratamento superovulatório (SOCS) (média ± ep, Vasques *et al.*, 1998).



No grupo suplementado com SOCS em que a progesterona atinge níveis mais elevados, verifica-se concomitantemente um aumento da velocidade de crescimento (Tabela 5) e qualidade dos embriões transferíveis ao 8º dia (Tabela 6).

Tabela 5. Influência dos tratamentos sobre o estadió de desenvolvimento embrionário de D7 a D9 (M = mórula, JBL = jovem blastócito, BL = blastócito, BLE = blastócito expandido, EXT = extrusados; 7 réplicas; Pereira *et al.* 1997).

Dia 7	(n)	M (%)	JBL (%)	BL (%)	BLE (%)
SOCS	73	21,91	14,0	9,58	54,79
OCS	72	23,61	15,0	22,22	38,89
χ^2		P>0,05	P>0,05	P≤0,037	P≤0,055

Dia 8	(n)	JBL (%)	BL (%)	BLE (%)	EXT (%)
SOCS	84	2,38	13,09	77,38	7,14
OCS	70	1,43	27,14	65,57	2,85
χ^2		P>0,05	P≤0,028	P>0,05	P>0,05

Dia 9	(n)	BL (%)	BLE (%)	EXT (%)
SOCS	84	1,19	72,61	26,19
OCS	73	12,32	71,23	16,43
χ^2		P≤0,004	P>0,05	P>0,05

Tabela 6. Influência dos tratamentos sobre a qualidade dos embriões de D8 (Pereira *et al.* 1997).

	Embriões em D8 (n)	Distribuição da classificação (%)			
		Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
SOCS	84	13,09	40,0	29,76	16,67
OCS	70	1,42	46,0	35,71	17,14
χ^2		P \leq 0,007	P $>$ 0,05	P $>$ 0,05	P $>$ 0,05

Neste trabalho é evidente um efeito luteotrófico bifásico dos próprios embriões, quando em presença de SOCS. Torna-se necessário estabelecer aqui uma relação de causa-efeito: haverá maior produção de progesterona devido à presença de embriões de melhor qualidade, ou os embriões apresentaram melhor qualidade e cresceram mais rapidamente porque as concentrações de progesterona eram superiores?

O objectivo deste primeiro projecto prende-se com a avaliação do efeito da progesterona e do tipo de co-cultura celular no crescimento embrionário *in vitro* até à fase de extrusão dos embriões. Pretende-se assim estudar o efeito da suplementação de progesterona durante a cultura *in vitro* sobre o crescimento embrionário, bem como a influência de diferentes tipos de co-cultura celular utilizada (granulosa e células epiteliais do oviducto – BOEC, produtoras e não produtoras de progesterona, respectivamente) sobre a taxa de fertilização, crescimento e produção de embriões.

Delineamento experimental

Durante a fase de co-cultura dos embriões serão organizados seis grupos experimentais:

Grupo 1 - Co-cultivados com células da granulosa.

Grupo 2 - Co-cultivados com células da granulosa suplementadas com onapristone (inibidor dos receptores da P4).

Grupo 3 - Co-cultivados com BOEC.

Grupo 4 - Co-cultivados com BOEC e suplementados com progesterona.

Grupo 5 - Co-cultivados com BOEC e suplementados com progesterona e onapristone.

Grupo 6 – Co-cultivados com BOEC e suplementados com onapristone.

Este delineamento experimental permitirá avaliar o efeito dos seguintes factores sobre o desenvolvimento embrionário:

1. O efeito da progesterona sintetizada fisiologicamente pelas células da granulosa *in vitro* (Granulosa vs Granulosa + onapristone)

2. O efeito da progesterona com células BOEC (BOEC vs BOEC + P4)
3. O efeito da inibição da acção da progesterona em ambas as culturas celulares (Granulosa vs Granulosa + onapristone e BOEC + P4 vs BOEC + P4 + onapristone);
4. O efeito do tipo de co-cultura na presença (Granulosa vs BOEC+P4) ou na ausência de progesterona (Granulosa + onapristone vs BOEC + P4 + onapristone);
5. O efeito do onapristone sem a presença de progesterona (BOEC vs BOEC + onapristone);
6. O efeito do tipo de co-cultura (Granulosa vs BOEC)

Serão estudadas as seguintes variáveis em todos os grupos experimentais:

1. Índice de fecundação (embriões clivados às 48h / oócitos inseminados);
2. Índice de embriões sobreviventes ao 8º dia (embriões ao dia 8 / embriões clivados);
3. Índice de embriões extrusados (embriões extrusados até ao 12º dia / embriões clivados);
4. Velocidade de crescimento embrionário (distribuição relativa ao 7ª, 8º e 9º dia de embriões nas suas diferentes fases de desenvolvimento: mórulas, jovens blastócitos, blastócitos, extrusados);
5. Qualidade dos embriões em D7-D8 (classificação, numa escala e 1 a 5, dos melhores (1) e dos piores embriões (5));
6. Uma amostragem de embriões D7-D8 de cada grupo, será submetida a coloração com o Hoechst 33342 e azul tripan, para determinar o número de blastómeros, a sua distribuição (botão embrionário e células do trofoblasto) e a sua viabilidade (coloração vital com azul tripan), através microscopia invertida com epifluorescência (descrito em detalhe no parágrafo 2.5.7).

2.2.2. Metodologia

Neste primeiro projecto as vacas dadoras de oócitos serão da raça *Holstein* e o sémen de um touro da mesma raça.

Os ovários e os oviductos bovinos utilizados neste estudo serão obtidos num matadouro próximo e transportados para o laboratório em PBS a 4°C, para a cultura das células e, a 37°C, para a produção de embriões (Marques *et al.*, 1997).

No trabalho anterior, chegou-se à conclusão que a viabilidade das células da granulosa em cultura era melhorada quando os ovários de onde provinham

eram acondicionados à temperatura de 4°C no transporte para o laboratório, do que transportando-os a 37°C.

Os procedimentos genéricos para a produção *in vitro* de embriões que se descrevem seguidamente, são apresentados detalhadamente no parágrafo 2.5.

a) Cultura de células epiteliais do oviducto bovino (BOEC)

Os oviductos de vacas abatidas em matadouro, depois de lavados e dissecados, serão submetidos a um flushing (lavagem luminal) com meio de Hank sem Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ e com antibiótico (ab) e antimicótico (am) para recolha das células epiteliais.

As BOEC serão cultivadas em poços com TCM199 +10% de SOCS+ab numa estufa incubadora a 39°C, com 5% de CO₂ e saturada de humidade. Estas culturas deverão ser sempre frescas e apresentarem células em monocamada e células ciliadas em suspensão (a partir de 4 a 6 dias de cultura) no início da co-cultura com embriões.

b) Cultura das células da granulosa.

As células da granulosa são obtidas quando da aspiração dos folículos com 2 a 6 mm de diâmetro. As células serão cultivadas em TCM199 + 10% de SOCS + antibióticos, em gotas de 100 µl colocadas em placas de cultura e cobertas por óleo mineral, na estufa incubadora a 39°C, com 5% de CO₂ e saturada de humidade. As monocamadas podem ser utilizadas para a co-cultura de embriões ao fim de 2 dias de cultura.

c) Maturação dos oócitos

Colheita de oócitos: Os ovários dadores serão transportados para o laboratório imediatamente após o abate dos animais em solução salina - fosfatada tamponizada (PBS) a 37°C. A esta solução são adicionados albumina sérica bovina (BSA, Fracção V, SIGMA, 0,3%, w/v) e antibióticos (Kanamicina, SIGMA, 0,05 mg/ml). O líquido folicular é aspirado de folículos entre 2 a 8 mm de diâmetro com seringa munida de agulha de 19 G e colocado em tubos de fundo cónico contendo líquido de recolha e lavagem de oócitos (TCM-199, GibCo), suplementado com 5% de soro de vaca em cio superovulada (v/v) e antibióticos (solução de 100 U/ml de penicilina e de 100 µg/ml de estreptomicina). Após decantação, o resíduo é observado à lupa para selecção de conjuntos de oócitos e células do cumulus (COC) compactos, seguindo apenas para cultura os oócitos que exibam um revestimento completo e com ooplasma uniforme.

Maturação: Os oócitos seleccionados são transferidos para placas de Petri contendo 3 ml de meio de maturação (TCM - 199) suplementado com 10% de soro de vaca em cio superovulada (v/v) , antibióticos (solução de 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) e algumas células da granulosa em suspensão. A maturação realiza-se em estufa a 39°C em atmosfera com 5% de CO₂ saturada de humidade durante 22 a 24 horas. Após este período, apenas os oócitos evidenciando clara expansão das células do cumulus seguem para a fertilização.

d) Preparação do sémen e fertilização

Os oócitos maturados, após lavagem e selecção, serão colocados em meio de fertilização (gotas de 40 µl para 10 oócitos), e inseminados com 1x10⁶ spz /ml, entretanto submetidos a um processo de swim-up em meio TALP com cafeína (485,5 µg/ml). Espermatozóides e oócitos permanecem durante 22 horas na estufa incubadora para se completar a capacitação e o processo de fertilização, os oócitos inseminados e embriões resultantes serão divididos nos 6 grupos experimentais referidos. O sémen utilizado será sempre do mesmo touro (raça *Holstein*).

e) Cultura dos embriões

Seguidamente os oócitos são transferidos para o meio de cultura de embriões (100 µl) contendo células da granulosa em monocamada ou BOEC com 48 horas de cultura. Quarenta e oito horas depois da fertilização *in vitro* se ter iniciado, procede-se à verificação e contagem dos oócitos clivados, que prosseguem o seu desenvolvimento *in vitro* até à fase de extrusão.

As concentrações de progesterona exógena a adicionar aos meios durante as culturas (células BOEC, grupos 4 e 5), serão similares às do dia 7 de cultura (48 ng/ml) previamente determinadas em co-culturas de células da granulosa com embriões (Vasques et al., 1998). Serão recolhidas alíquotas de meio de cultura das células com embriões, em todos os grupos e ao longo de toda a co-cultura, para doseamento de progesterona por radioimunoensaio em fase sólida.

O antagonista da progesterona permitirá impedir o efeito da P4 quer nas co-culturas da granulosa (síntese fisiológica *in vitro*), quer nas BOEC suplementadas com a hormona. Num trabalho anterior realizado no nosso Departamento (Cavaco Gonçalves et al., 1997) foram testadas duas concentrações do onapristone

adicionadas durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos ($5,56 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ e $2,22 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$). Os resultados demonstraram que a menor concentração utilizada não afectou a maturação nem a fertilização dos oócitos, pelo que será esta a dose a utilizar neste projecto durante a cultura dos embriões nos Grupos 2, 5 e 6.

Todos os resultados serão tratados estatisticamente utilizando testes de qui-quadrado em factorial 2x2 e a análise de variância quando indicado. Serão estabelecidas correlações entre a qualidade dos embriões em D8 e sua velocidade de crescimento com a quantidade, distribuição (botão embrionário vs. trofoblasto) e viabilidade de blastómeros encontrados, as quais serão comparadas entre os diferentes grupos por análise de variância. Os ensaios *in vitro* de produção de embriões utilizarão o mínimo de 10 réplicas por tratamento.

Uma pequena amostragem de embriões de cada grupo deste projecto e do projecto seguinte será criopreservada guardando-se assim material genético embrionário que poderá vir a servir para estudos sobre eventuais alterações precoces dos genes que no futuro venham a ser identificados como responsáveis pelas alterações produzidas pela técnica, suplementação de progesterona e tipo de co-cultura na expressão do crescimento embrionário e fetal.

2.3. Projecto 2: Susceptibilidade de raças nacionais ao efeito da progesterona e da técnica IVP sobre o crescimento embrionário e fetal, dificuldade ao parto e crescimento pós-natal.

2.3.1. Objectivos

Os trabalhos de Numabe *et al.* (1997) e de Stacchezzini *et al.* (1997) sugerem a existência de uma interacção entre o genótipo e a técnica de produção de embriões IVP sobre o crescimento do feto e o seu peso ao nascimento. No primeiro caso, trabalhando com uma raça de pequeno porte em adulto (raça *preta japonesa*), a diferença observada entre fetos IVP, embora significativa, foi muito pequena (cerca de 2 kg). No segundo caso, o trabalho com dadoras de raça *Piedmontesa* (de grande porte em adulto), evidenciaram-se diferenças muito mais elevadas nos pesos ao nascimento (9 kg). A utilização de embriões IVP sem controlo da raça das dadoras de oócitos (cruzamentos para carne), apresentou resultados semelhantes aos obtidos na raça *Piedmontesa* (Horta *et al.*, 1992).

Este projecto pretende avaliar diferenças no crescimento *in vitro* de embriões em duas raças bovinas nacionais e a sua susceptibilidade ao efeito da progesterona. Além do crescimento dos embriões, será avaliado o padrão de crescimento intra-uterino dos fetos das diferentes raças durante gestações induzidas pela transferência de embriões produzidos *in vitro*. Este padrão de crescimento intra-uterino será correlacionado com a produção de hormonas durante a gestação. A dificuldade ao parto, sobrevivência dos nascituros e o crescimento pós-natal serão igualmente estudados.

Seleção das raças dadoras de oócitos, maturação e fertilização in vitro:

Serão seleccionadas para este trabalho como dadoras de oócitos, uma raça de pequeno porte em adulto (*Mertolenga*) e uma de porte mais elevado (*Alentejana*). Os pesos das fêmeas adultas da raça *Mertolenga* situam-se entre os 300 e 400 kg enquanto que para a raça *Alentejana* esse peso ronda os 650-700 kg.

Para garantir uma disponibilidade suficiente de ovários no matadouro, terá que ser desenvolvido um acordo de cooperação com as associações de criadores destas raças no sentido de se utilizar um matadouro de referência para abate das fêmeas, localizado perto do laboratório.

A maturação dos oócitos e a fertilização *in vitro* será realizada de acordo com a metodologia apresentada no projecto anterior. Para a fertilização será utilizado sémen de raça homóloga a cada uma das raças dadoras de oócitos, utilizando sempre o mesmo touro para cada raça.

2.3.2. Estudo 1: Efeito da progesterona e da co-cultura celular sobre o crescimento embrionário *in vitro* em raças autóctones.

Delineamento experimental

O efeito da progesterona sobre o crescimento embrionário *in vitro* será testado para cada uma das raças dadoras de oócitos consideradas comparando, para a mesma raça e entre as diferentes raças, embriões em co-cultura com células epiteliais uterinas (BOEC) suplementados ou não com progesterona. Será utilizada a mesma metodologia que no projecto 1, quer quanto ao método de cultura quer quanto aos critérios de avaliação do crescimento do embrião (avaliação do estadio de desenvolvimento durante a co-cultura., qualidade dos embriões e numa amostragem, a quantificação, vitalidade e distribuição dos blastómeros).

Durante a fase de co-cultura dos embriões de cada um dos genótipos considerados (*Mertolengo* x *Mertolengo*; e *Alentejano* x *Alentejano*), serão organizados quatro grupos experimentais:

Grupo 1 - Co-cultivados com BOEC.

Grupo 2 - Co-cultivados com BOEC e suplementados com progesterona.

Grupo 3 - Co-cultivados com BOEC e suplementados com progesterona e onapristone.

Grupo 4 – Co-cultivados com células da granulosa

Este delineamento experimental permitirá avaliar o efeito dos seguintes factores sobre o desenvolvimento embrionário em cada genótipo considerado:

- 1 O efeito da progesterona com células BOEC (BOEC vs BOEC + P4);
- 2 O efeito da inibição da acção da progesterona em células BOEC (BOEC + P4 vs BOEC + P4 + onapristone);
- 3 O efeito do tipo de co-cultura (Granulosa vs BOEC; Granulosa vs. BOEC +P4)

Serão estudadas as seguintes variáveis em todos os grupos experimentais:

1. Índice de fecundação (embriões clivados às 48h / oócitos inseminados);
2. Índice de embriões sobreviventes ao 8º dia (embriões ao dia 8 / embriões clivados);
3. Índice de embriões extrusados (embriões extrusados / embriões clivados);
4. Velocidade de crescimento embrionário (distribuição relativa ao 7º e 8º dia de embriões nas suas diferentes fases de desenvolvimento: mórulas, jovens blastócitos, blastócitos, extrusados);
5. Qualidade dos embriões em D7-D8 (classificação, numa escala e 1 a 5, dos melhores (1) e dos piores embriões (5));
6. Uma amostragem de embriões em fase de blastócito de cada grupo, será submetida a coloração com o Hoechst 33342 e azul tripan, para determinar o número de blastómeros, sua distribuição (botão embrionário vs. células do trofoblasto) e viabilidade (coloração vital com azul tripan) através microscopia invertida com epifluorescência.

Os restantes embriões do dia 8 em fase de mórula ou blastócito de cada grupo (suplementado ou não com progesterona) serão criopreservados e transferidos posteriormente para vacas receptoras (estudo 2 do projecto 2).

A congelação dos embriões será efectuada seguindo o protocolo de congelação utilizado no Departamento de Reprodução (Horta *et al.*, 1996):

1. Selecção e classificação dos embriões a transferir ou congelar (em fase de mórula compacta ou blastócito);
2. Os embriões seleccionados são transferidos para um meio constituído por PBS enriquecido com 15% de soro de feto de bovino (FCS) e transferidos de novo para um 2º meio de PBS + 15% de FCS + 5% de glicerol. Aqui permanecem 10 minutos sendo de seguida transferidos para um 3º meio idêntico ao anterior mas enriquecido com 10% de glicerol;
3. Após 10 minutos realiza-se a aspiração de um ou mais embriões para palhinhas de Cassou, ficando os mesmos acondicionados numa gota central separada por duas bolhas de ar do meio em contacto com as extremidades da palhinha;
4. Imersão das palhinhas a congelar no líquido (metanol) contido na cuba do aparelho de congelação (Bio-Cool III);
5. Congelação programada em três rampas: dos 10°C a -7°C à razão de 2°C/min (aqui é realizado o seeding); dos -7°C aos -30°C à razão de 0.3°C/min; dos -30°C aos -35°C à razão de 0.1°C/min. Após 15 min. de estabilização a -35°C, as palhinhas são introduzidas directamente em azoto líquido (-196°C) onde permanecem até à descongelação.

2.3.3. Estudo 2. Caracterização do crescimento fetal, dificuldade ao parto e crescimento pós-natal em raças portuguesas, utilizando embriões IVP.

Delineamento experimental

Serão utilizados neste estudo os embriões IVP congelados provenientes dos grupos constituídos no estudo anterior, os quais serão transferidos para fêmeas receptoras:

Grupo 1 - Co-cultivados com BOEC.

Grupo 2 - Co-cultivados com BOEC e suplementados com progesterona.

Grupo 3 - Co-cultivados com BOEC e suplementados com progesterona e onapristone.

Grupo 4 – Co-cultivados com células da granulosa

Este delineamento experimental permitirá avaliar o efeito dos seguintes factores sobre o desenvolvimento do feto, para cada genótipo considerado:

1. O efeito da progesterona com células BOEC (BOEC vs. BOEC + P4);
2. O efeito da inibição da acção da progesterona em células BOEC (BOEC + P4 vs. BOEC + P4 + onapristone);
- 3 O efeito do tipo de co-cultura durante o desenvolvimento embrionário (Granulosa vs. BOEC; Granulosa vs. BOEC + P4)

Como receptoras de todas as raças de embriões (*Mertolengo x Mertolengo* e *Alentejano x Alentejano*) serão utilizadas fêmeas de uma única raça (*Holstein*), de forma a poder avaliar-se o efeito do genótipo fetal na produção de hormonas e proteínas da gestação.

As vacas receptoras serão sincronizadas e a transferência dos embriões anteriormente congelados será efectuada ao 8º dia do ciclo sincronizado. A sincronização do ciclo das vacas receptoras será efectuada através de um tratamento com progestagénios durante 12 dias (implantes auriculares contendo norgestomet), uma injeção de prostaglandina F2 α em dose luteolítica (via intravulvo-submucosa, Horta *et al.*, 1986) e uma injeção i.m. de 500 UI de PMSG, no final do tratamento progestagénico.

Os embriões produzidos *in vitro* serão descongelados de acordo com o seguinte protocolo, utilizado no nosso laboratório (Horta *et al.*, 1996):

1 - Depois de retiradas do contentor de azoto líquido, as palhinhas a descongelar são mantidas na atmosfera do laboratório durante 10 segundos. Em seguida, são mergulhadas em água a 37°C durante 30 segundos. Os embriões são transferidos então para um meio de PBS com 15% de FCS, enriquecido com 0,25 M de sucrose e 5% de glicerol, onde permanecem durante 5 minutos. Em seguida transferem-se para uma 2ª placa de Petri contendo PBS + 15% de FCS + 0,25 M de sucrose onde permanecem durante 5 minutos. Finda esta etapa, que permitiu a descongelação e rehidratação celular (efeito da sucrose), os embriões são lavados em dois meios de PBS + 15% de FCS durante 10 minutos em cada banho, estando prontos para serem classificados e seleccionados.

2 - Os embriões seleccionados são aspirados para palhinhas de Cassou em meio de PBS + 15% de FCS devidamente identificadas e colocadas na vertical em termos a 22°C. Estão assim prontos para serem transportados para o campo e transferidos para as vacas escolhidas como receptoras.

Serão recolhidas amostras de plasma sanguíneo a todas as receptoras um dia antes da transferência (para confirmação da ovulação e presença de um corpo lúteo), aos 21 dias pós ovulação (para diagnóstico precoce de não gestação) e daí em diante mensalmente durante toda a gestação.

Será doseada a progesterona em todas as amostras, e a partir do 21º dia o lactogénio placentário bovino (bPL) e a proteína B específica da gestação bovina (bPSPB). Os doseamentos serão efectuados por rádioimunoanálise em fase sólida, utilizando kits comerciais no caso da progesterona e do bPL ou recorrendo ao laboratório da UNCEIA no caso da bPSPB.

O crescimento do feto será avaliado através de ecografias realizadas semanalmente até aos 115 dias de gestação, por medição da curvatura dorsal do feto (crown rump - CR). O crescimento ulterior será avaliado pela seguinte fórmula: $(CR \text{ aos } 115 \text{ dias} - CR \text{ ao nascimento}) / (\text{duração da gestação} - 100 \text{ dias})$.

A cinética do crescimento fetal até ao 4º mês de gestação será comparado para fetos da mesma raça entre os grupos suplementado e não suplementado com P4 durante a fase embrionária e para fetos de raças diferentes entre grupos homólogos quanto à suplementação. Os índices de crescimento observados durante a gestação serão correlacionados com o crescimento embrionário *in vitro* e o crescimento pós-natal dos vitelos.

O mesmo tipo de comparações será efectuado relativamente à cinética do bPL e da bPSPB ao longo da gestação.

O peso dos vitelos ao nascimento será igualmente comparado entre os diferentes grupos considerados.

Com as devidas adaptações, será utilizado o modelo estatístico apresentado no Projecto 3 (descrito em 2.4.1.) integrando as variáveis que estiverem significativamente associadas ao crescimento fetal, peso ao parto e crescimento pós-natal.

O grau de facilidade de parto será avaliado segundo os seguintes critérios:

Ausência de assistência	1
Assistência sem emprego de meios mecânicos	2
Assistência com emprego de meios mecânicos	3
Cesareana	4

O crescimento dos vitelos após o parto será avaliado através de pesagens semanais até aos 100 dias de idade. Para minimizar o efeito da capacidade leiteira das receptoras no crescimento dos vitelos, estes passarão a um regime de aleitamento artificial a partir dos 5 dias de idade.

Devido a uma política de protecção ao extensivo, que subsidia as fêmeas reprodutoras aleitantes, pode tornar-se muito difícil vir a obter em matadouro uma quantidade suficiente de fêmeas abatidas que permita viabilizar este projecto.

Esta dificuldade pode ser ultrapassada utilizando em complementaridade a colheita de oócitos em animais vivos por aspiração folicular utilizando o sistema ecográfico associado a um dispositivo de aspiração por via vaginal (*ovum-pick-up* – OPU). Esta técnica permite fazer colheitas de oócitos não maturados no mesmo animal durante largos períodos de tempo e poderá ser implementada de acordo com os métodos descritos por vários autores (Kruip et al., 1991, Pieterse et al., 1991, Simon et al., 1993). Se existe a desvantagem de haver menos oócitos disponíveis por cada sessão do que no caso de haver fêmeas disponíveis para abate, por outro lado existe a vantagem de se diminuir a variabilidade do crescimento dos embriões e fetos associada às dadoras.

2.4. Projecto 3: Influência da técnica de produção de embriões (IVP, IA e MOET) e da progesterona sobre o desenvolvimento do feto, peso ao nascimento e crescimento pós-natal em duas raças autóctones.

Neste projecto pretende-se comparar o efeito da técnica de produção de embriões *in vitro* vs. *in vivo* sobre o desenvolvimento do feto e peso dos vitelos ao nascimento em duas raças nacionais, quando os embriões são expostos ou não à influência da progesterona.

Serão constituídos os seguintes grupos:

I - Embriões produzidos totalmente *in vitro* (IVP) utilizando co-culturas de células da granulosa (IVP, expostos à acção da progesterona);

II - Embriões IVP utilizando co-culturas de células da granulosa suplementadas com um antagonista da progesterona (IVP, não expostos à acção da progesterona);

III - Embriões produzidos pelo método da superovulação (MOET - *in vivo*, expostos à acção da progesterona);

IV - Inseminação artificial (IA - *in vivo*, expostos somente a concentrações fisiológicas de progesterona).

Os estudos incidirão em duas raças nacionais: *Mertolenga* e *Alentejana*, podendo mais tarde ser realizados noutras raças desde que exista um núcleo de fêmeas receptoras para as gestações que viabilize o estudo.

Será sempre utilizado o mesmo touro de cada uma das raças a estudar para realizar a fertilização *in vitro* (grupos IVP) e *in vivo* (MOET e IA).

As vacas receptoras de embriões (IVP e MOET) e as inseminadas (IA) serão de raças homólogas aos embriões transferidos ou fruto da IA. Assim, existirá um núcleo de fêmeas de raça *Mertolenga* e outro de raça *Alentejana*.

A gestação, parto e pós-parto serão acompanhados como no estudo 2 descrito em 2.3.3, havendo lugar à avaliação do desenvolvimento fetal até aos 115 dias por ultrasonografia, das concentrações de bPSPB e bPL ao longo da gestação, da duração da gestação, do peso ao nascimento e do crescimento dos vitelos até aos 100 dias de idade.

2.4.1. Modelo estatístico

Os factores anteriormente considerados serão comparados entre os diferentes grupos para cada uma das raças e entre as duas raças, através de um modelo completamente casualizado por análise de variância, sendo estabelecidas correlações entre eles dentro de cada grupo e entre grupos.

Será realizada ainda uma integração das variáveis que contribuem para explicar o crescimento do feto até aos 115 dias (1), daí até ao nascimento(2), o peso ao parto (3) crescimento do vitelo até aos 100 dias (4) através equações de regressão múltipla, sendo as variáveis independentes seleccionadas através do método de Stepwise (computação electrónica através do programa Statistica, Statsoft 1995). Estas equações múltiplas serão calculadas para cada um dos grupos de gestação considerados e respectivos genótipos, podendo vir a integrar as seguintes variáveis:

Variáveis independentes a seleccionar pelo modelo:

CBE - células do botão embrionário

CT - células do trofoblasto

PSPB - produção diária de bPSPB ao longo da gestação

PSPB1 - produção diária de bPSPB até aos 115 dias de gestação

PSPB2 - produção diária de bPSPB após os 115 dias de gestação

PL- produção diária de bPL ao longo da gestação

PL1- produção diária de bPL até aos 115 dias de gestação

PL2 - produção diária de bPL após os 115 dias de gestação

PV - peso do vitelo ao parto

DG - duração da gestação

DF – dificuldade ao parto (avaliada como no Projecto 2 - Estudo 2)

Quando considerada como variável dependente o crescimento pós-natal (Y_4) serão adicionados ao modelo os crescimentos do feto até aos 115 dias, entre os 115 e o parto e o peso ao parto. Quando considerado o peso ao parto (Y_3) serão adicionados ao modelo os crescimentos do feto até aos 115 dias e entre os 115 dias e o parto. Quando considerado o crescimento fetal depois dos 115 dias (Y_2) será adicionado ao modelo o crescimento nos primeiros 115 dias.

As equações obedecerão assim ao seguinte modelo (Y_{1-4} = variáveis dependentes; a = origem; e = média residual dos coeficientes de regressão):

$$Y_{1-4} = a + CBE_j + CT_k + PSPB_l + PSPB1_m + PSPB2_n + PL_o + PL1_p + PL2_q + PV_r + DG_s + DF_t + e_{jklmnopqrst}$$

Será assim possível verificar o efeito da técnica de embriões IVP nos diferentes factores estudados e simultaneamente evidenciar a existência ou não de interacção entre a raça e a técnica.

2.4.2. Metodologia específica

a) Protocolo de superovulação e recolha de embriões (MOET; Lopes da Costa, 1995)

As vacas dadoras serão sincronizadas pelo método Crestar (Implante Norgestomet durante 11 dias). No dia da extracção do implante os animais recebem PGF2 alfa (2,5 mg i.v.s.m). Durante os últimos 4 dias do tratamento progestagénico, cada fêmea receberá uma dose de 50 mg i.m. de FSH-P (Foltropin-V), duas vezes por dia.

A recolha de embriões será efectuada ao 7º dia após a inseminação das fêmeas superovuladas (9º dia após a extracção dos implantes) pelo método não cirúrgico, tal como descrito por Lopes da Costa (1995). As fêmeas são imobilizadas num tronco de contenção. A zona perineal é lavada com água e sabão e seca com toalhetes de papel. Realiza-se uma anestesia epidural baixa com 5-7 ml de cloridrato de lignocaína a 2% (20 mg/ml; Xilocaína, Astra). Para a lavagem uterina utiliza-se um catéter de Foley de duas vias de 18 FG e balão de 15 ml (Silkolatex, Rush-Gold), acoplado a um tubo de silicone de 20 cm de comprimento, ficando o conjunto rígido através de um estilete de metal de 75 cm de comprimento introduzido internamente e fixado externamente por uma pinça hemostática. O catéter é protegido por uma camisa sanitária (ZA060, IMV) e é introduzido através da vagina, sendo a camisa sanitária descartada quando o catéter alcança o fundo de saco vaginal. O catéter é conduzido transrectalmente através do cérvix até a extremidade alcançar a curvatura uterina maior do corno uterino a lavar e fixado ao lúmen endometrial através da insuflação do balão com 10-13 ml de ar. Após a extracção do estilete, o meio de lavagem é instilado através de seringas de 50 ml e recolhido por gravidade para um frasco colector de 0,5 l, graduado e esterilizado. A saída do meio é controlada através de uma pinça hemostática aplicada externamente no catéter. São instilados 50-100 ml de meio de lavagem de cada vez, consoante as dimensões do corno, prefazendo um total de 200-300 ml por corno uterino. Após a última instilação procede-se à massagem uterina, o balão é esvaziado e o catéter retirado, repetindo-se todo o

processo para o outro corno uterino. O meio de lavagem fica armazenado em banho-maria à temperatura de 37°C até à pesquisa dos embriões.

b) Meio de lavagem uterina (Lopes da Costa, 1995)

A composição do meio de lavagem uterina para a recolha dos embriões é a seguinte: 9,804 g de PBS (modificada por Dulbecco, Flow Laboratories); 1 g de α -D-Glucose (Serva); 33 mg de piruvato de sódio (Serva); 10 ml de uma solução contendo 5000 UI/ml de penicilina e 5000 μ g/ml de estreptomicina (Flow Laboratories); 10 ml de uma solução contendo 0,25 mg/ml de fungizona (Amphotericina B, Serva); água tratada pelo método Mili-Q (18 M Ω cm a 25°C; Millipore) q.b. para 1 litro. Os constituintes são pesados e adicionados a 0,5 l de água e submetidos a agitação magnética-térmica até à sua completa dissolução, sendo posteriormente adicionado a restante água. O pH foi medido e corrigido a 7,2-7,3 através da adição de HCL 1M ou NaOH 1M. O meio é filtrado em ambiente de câmara de fluxo laminar horizontal, utilizando uma bomba peristáltica e através de pré-filtro de poro médio de 8 μ m (AP15, Millipore) e de filtro de poro médio de 0,22 μ m (Durapore, Millipore) para frasco esterilizado e graduado de 1 litro. O meio deve ser utilizado nas 24-48 horas seguintes à sua preparação, devendo ser acondicionado em frigorífico. Antes da utilização o meio é aquecido em banho-maria a 37 °C e adicionado de 200 mg de albumina sérica bovina (BSA, Serva). A BSA deve ser previamente pesada em alíquotas individuais de 200 mg e armazenada em criotubos de 1,5 ml (Greiner) a -20 °C.

c) Processamento de embriões (Lopes da Costa, 1995)

O meio recolhido da lavagem uterina é passado através de um filtro com poro médio de 70 μ m (EmCon Embryo Concentrator, Imuno Systems Inc.) e a coluna retida no filtro vertida para uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro e fundo quadriculado, sendo feita a lavagem do filtro por fluxo retrógrado para uma segunda placa. As placas são observadas numa lupa binocular com base diascópica e fonte de luz fria com uma ampliação de 10x. Após identificação, os embriões são colocados numa placa multialveolar com 24 (4x6) poços (Nuclon, Nunc) contendo meio de cultura (Ovum Culture Medium, Flow Laboratories), mantida numa mesa térmica à temperatura de 37°C e coberta com papel de alumínio. Os embriões são colocados em 3 banhos sucessivos de meio (10 minutos cada) e são avaliados numa outra lupa

com uma ampliação de 64x. A avaliação é feita com base em parâmetros morfológicos e classificados quanto ao estadió de desenvolvimento (oócitos não fecundados, 2 células a jovem mórula, mórula compacta, jovem blastócito e blastócito expandido) e qualidade (1-5). A qualidade é apreciada de acordo com a forma embrionária; integridade da pelúcida; volume do espaço perivitelino; número, textura e coloração das células; e grau de agregação ou compactação celular.

d) Congelação dos embriões produzidos por superovulação

Os embriões classificados como transferíveis (mórulas ou blastócitos até grau 3) são congelados para posterior transferência para as vacas receptoras. A congelação dos embriões produzidos *in vivo* é realizada colocando-os em meio de cultura (Ovum Culture Medium, Flow Laboratories) contendo 10 % v/v de glicerol (Merck) durante 10 minutos e acondicionando-os em palhinhas de 0,25 ml (Paillette Cristal, ZA473 IMV). Estas são em seguida colocadas no interior da câmara de congelação (BioCool III, FTS Systems). Utiliza-se a seguinte curva de congelação: colocação das palhinhas a -6°C ; 1 patamar de 10 minutos; seeding através de toque com pinça arrefecida em azoto líquido na extremidade superior da coluna de meio que contém o embrião; 1 patamar de 10 minutos; arrefecimento à razão de $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até aos -32°C ; 1 patamar de 10 minutos; imersão em azoto líquido onde permanecem até à descongelação.

e) Descongelação dos embriões produzidos por superovulação

A descongelação realiza-se colocando as palhinhas em banho-maria a 25°C durante 30 segundos. O conteúdo da palhinha é vertido para placas de Petri e o embrião é identificado à lupa. Seguidamente passam-se os embriões sucessivamente pelos seguintes banhos: meio de cultura contendo 6,6 % v/v de glicerol e 0,3M de sucrose durante 10 minutos; meio de cultura contendo 3,3% v/v de glicerol e 0,3M de sucrose durante 10 minutos; meio de cultura contendo 0,3M de sucrose durante 10 minutos; 2 banhos em meio de cultura durante 10 minutos cada. Após classificação, os embriões são acondicionados em palhinhas de 0,25 ml em meio de cultura separando três colunas de meio com duas bolhas de ar, ficando o embrião residente na coluna central.

2.5. Protocolo de base para a produção de embriões *in vitro* (protocolos utilizados no Departamento de Reprodução da EZN; extraído de Marques, 1998)

Numerosos protocolos existem para a produção *in vitro* (IVP) de embriões bovinos. Apresentamos as várias fases do processo, tal como está instituído actualmente no laboratório de embriologia do Departamento de Fisiologia e Reprodução Animal da EZN. As referidas fases compreendem a maturação dos oócitos (IVM), a sua fertilização (IVF) e cultura dos embriões resultantes (IVC). As técnicas baseiam-se nos trabalhos de Lu e col. (1987), tendo sido implementadas sob orientação científica do Doutor W. Wang (1992).

2.5.1. Colheita dos ovários

Os ovários são recolhidos num matadouro próximo do laboratório, imediatamente após o abate de vacas ou novilhas. Estes ovários colocam-se aleatoriamente em garrafas térmicas contendo solução de PBS enriquecida e previamente aquecida a 37° C, sendo depois transportados para o laboratório num espaço de tempo máximo de duas horas após o abate.

No laboratório, procede-se à lavagem dos ovários por duas a três passagens sucessivas em PBS aquecido a 37° C, em copo de vidro esterilizado. Após a lavagem dos órgãos, segue-se a fase de aspiração do líquido folicular.

2.5.2. Aspiração dos oócitos

Efectua-se a aspiração do conteúdo dos folículos de 2 a 6 mm de diâmetro presentes na superfície dos ovários através de punção com agulha 19-g ajustada a seringa de 10 ml, ambas esterilizadas. Os folículos maiores que 6 mm ou evidenciando sinais de atresia (cor escura) são desprezados. Durante a aspiração, o copo de vidro, contendo os ovários, está mergulhado em banho-maria a 37° C, sendo esta operação e as seguintes efectuadas em ambiente esterilizado em câmara de fluxo laminar a uma temperatura de 25° C.

Depois da aspiração de cada ovário, o conteúdo da seringa é lentamente vertido para tubos esterilizados de fundo cónico contendo 2 a 3 ml de meio de lavagem de oócitos (W1). Uma vez processado o último ovário do lote recolhido no

matadouro, os tubos mantêm-se em repouso durante alguns minutos para permitir que os oócitos sedimentem no fundo cónico. O sobrenadante é então decantado e eliminado, enquanto o resíduo, constituído por células da granulosa e oócitos rodeados de células do *cumulus* (COC), é vertido para placas de Petri esterilizadas de 50 mm de diâmetro.

Dilui-se este resíduo em meio de recolha e lavagem de oócitos (W1), observando-se à lupa com pequena ampliação para a separação dos oócitos. Estes vão sendo transportados através de pipeta de vidro esterilizada para uma placa de Petri de 35 mm de diâmetro, contendo meio limpo de lavagem (W1). Segue-se a selecção dos oócitos e a sua passagem para placa de cultura, contendo meio de maturação. São apenas seleccionados os COC que evidenciem um citoplasma uniformemente granuloso, rodeados de 3 a 4 camadas de células do *cumulus* não expandidas.

O resíduo final, já separado da totalidade dos oócitos, contendo apenas células da granulosa e outros resíduos foliculares, é vertido para tubos de vidro e centrifugado durante 5 minutos a 500 g. Após a decantação do sobrenadante, dilui-se o resíduo final em meio de maturação de oócitos (MC de oócitos), obtendo-se uma suspensão final que se homogeneíza por intermédio de uma agulha 19-g e seringa de 1 ml. A suspensão obtida irá ser utilizado para a suplementação do meio de maturação dos oócitos primários com células da granulosa, na concentração de 3 a 5×10^6 células por mililitro de meio.

2.5.3. Maturação dos oócitos primários

Os oócitos primários, seleccionados de acordo com os critérios já referidos, são transferidos para placas de cultura esterilizadas, de 35 mm de diâmetro, contendo 3 ml de meio de cultura de oócitos (MC de oócitos), em número variando entre os 80 a 120. Ao meio de cultura adicionam-se células da granulosa na concentração de 3 a 5×10^6 células mL⁻¹, retiradas da suspensão acima referida. Os oócitos são incubados em estufa a 39°C e a 5% de CO₂, em ambiente saturado de humidade, durante 22 a 24 horas.

Após este período, a avaliação da maturação dos oócitos secundários é realizada à lupa (numa ampliação entre $\times 10$ e $\times 20$) baseando-nos em critérios

morfológicos, seguindo para a fertilização os oócitos com ooplasma uniforme ou regular, não muito claro nem muito escuro, evidenciando um grau elevado de expansão das células do *cumulus* (Hunter e Moor, 1987). A taxa de maturação corresponde à razão entre o número de oócitos dados como maturados à observação microscópica cerca de 22 a 24 horas após o início do período de cultura e o número de oócitos seleccionados para iniciarem a sua cultura.

A taxa de maturação pode também avaliar-se sujeitando uma amostragem dos oócitos à respectiva fixação e coloração nucleares, sendo considerados maturados os oócitos observados em metafase II com microscópio óptico de grande ampliação ($\times 800$). Neste estadio, observa-se um grupo de cromossomas emparelhados e espalhados, correspondentes ao oócito secundário, e outro, nem sempre visível, de cromossomas aglutinados correspondentes ao 1º glóbulo polar.

2.5.4. Capacitação *in vitro* do sémen bovino

Para adquirir a sua capacidade de penetração no oócito, os espermatozóides devem sofrer *in vitro* uma série de modificações, correspondentes às modificações observadas *in vivo* durante a sua passagem pelo aparelho reprodutor feminino. Estas alterações, denominadas no seu conjunto como capacitação, incluem a remoção gradual das camadas glicoproteicas da superfície dos espermatozóides, especialmente da região do acrosoma, permitindo a exposição de receptores, os quais irão ligar-se aos receptores do oócito. O aumento da motilidade ou hiperactivação é outra das características adquiridas pelos espermatozóides durante a capacitação.

O sémen congelado dos touros seleccionados é processado pelo Centro de Estudos de Selecção, Reprodução e Inseminação Artificial (Venda Nova, Amadora), em minipalhinhas de Cassou de 0,25 ml de volume, dentro de contentores de azoto líquido. Procede-se à descongelação da minipalhinha durante 30 a 40 segundos em água Milli-Q contida em copo de vidro esterilizado e previamente aquecida a 37°C. Retirada da água, a minipalhinha é imediatamente seca com um pano macio, para evitar qualquer contacto entre a água e o sémen, e o seu conteúdo vertido, após o corte das duas extremidades, para um tubo de vidro esterilizado de fundo redondo.

O sémen correspondente a cada palhinha, suficiente para inseminar 200 oócitos *in vitro*, é aspirado com seringa de 1 ml adaptada a agulha de 19-g e

cuidadosamente depositado, em doses iguais, no fundo de outros dois tubos de vidro esterilizados de fundo redondo. Cada tubo contém já 1,2 ml de meio de capacitação (CAP), previamente equilibrado. O sémen segue então para a incubadora durante 1 hora, em atmosfera de 5% de CO₂, a 39°C e com humidade máxima. Durante este período realiza-se o *swim-up*, processo pelo qual os espermatozóides mais activos progridem até à superfície do líquido de capacitação, aí se concentrando.

Após o período de *swim-up*, o sémen é retirado da incubadora, sendo recolhido com pipeta o sobrenadante de ambos os tubos, num volume correspondente a 2 ml de meio de capacitação contendo os espermatozóides de maior vitalidade. O sobrenadante total é colocado num único tubo de vidro de fundo cónico. Segue-se a sua centrifugação a 500g durante 10 minutos. Após a centrifugação, procede-se a nova aspiração do sobrenadante e à sua eliminação. Os mesmos espermatozóides encontram-se agora concentrados num volume de 0,2 ml de meio de capacitação, no fundo do tubo cónico de centrífuga .

A determinação, em hematímetro de tipo Neubauer, do número de espermatozóides existente neste concentrado, após a diluição a 1:20 de uma pequena amostra de 5µl, permite informar-nos sobre a dose de sémen a utilizar durante a inseminação dos oócitos, de modo que a sua concentração nas gotas de fertilização corresponda a 1×10^6 espermatozóides (spz) mL⁻¹.

De facto, após a contagem do número de espermatozóides existentes nos 4 quadrados externos maiores da câmara de Neubauer, e considerando que a superfície de cada quadrado é de 1 mm², sendo a altura da câmara de 0,1 mm, aplica-se a seguinte fórmula: $X = N \times 5000$. Nesta fórmula, a variável X representa o volume em µl do concentrado de espermatozóides a adicionar a cada gota de 40 µl de meio de fertilização, sendo N o número de espermatozóides contados.

2.5.5. Fertilização *in vitro*

A fertilização realiza-se em microgotas de 40 µl de meio de fertilização (FERT), submersas em óleo mineral, dispostas em número de 12 sobre cada placa de Petri (Sterilin, ref.), de 50 mm de diâmetro, previamente equilibradas na incubadora a 39°C durante pelo menos 2 horas antes. Para cada microgota são transferidos 10 oócitos maturados com apenas 1 a 2 camadas de células do *cumulus*. No nosso

sistema de produção, os oócitos maturados, antes da fertilização, são sujeitos a pipetagens frequentes em meio de lavagem modificado (W_2), para afastamento das referidas células. Adiciona-se finalmente o sémen capacitado, numa dose que varia entre 2 e 5 μL , correspondente à concentração final de 1×10^6 espermatozóides mL^{-1} .

A fertilização realiza-se em estufa com 5% de CO_2 , à temperatura de 39°C e a uma humidade elevada, durante 24 horas. Após este período, transferem-se os oócitos inseminados para placas de cultura celular (Nunclon, Nunc) contendo gotas com mono-camadas de células da granulosa, já com um período de cultura de 48 horas.

Entre as 44 e as 48 horas após a inseminação, os oócitos são observados à lupa para avaliação da sua taxa de clivagem, correspondente à razão entre o número de embriões que se encontram no estadio de duas ou mais células até esse período e o número de oócitos inseminados.

2.5.6. Cultura de embriões *in vitro*

No sistema por nós adoptado para produção de embriões bovinos *in vitro*, os embriões desenvolvem-se mantendo o contacto permanente com monocamadas confluentes de células da granulosa. Estas células são cultivadas em gotas de meio de cultura de embriões (MC de embriões) dispostas em pacas de cultura de 50 mm de diâmetro. Cerca de 24 horas após a inseminação, os presumíveis zigotos são transferidos para estas gotas, em número não superior a 30 por gota, aí se mantendo durante todo o seu período de desenvolvimento. O crescimento realiza-se em estufa a 39°C com atmosfera de 5% de CO_2 e ar saturado de humidade. A remoção das células excedentárias e a renovação do meio é feito de dois em dois dias com meio de cultura de embriões.

A observação do desenvolvimento embrionário inicia-se, como dissemos, desde a fase de duas células, verificada entre as 44 e as 48 horas após a inseminação (pi), até à fase de eclosão da zona pelúcida, ocorrida entre o 9° e o 11° dias pi , passando pelos estadios de mórula compacta (6° dia), de jovem blastócito (7° dia), blastócito (8° dia) e blastócito expandido (9° ao 11° dias). Os embriões são classificados numa escala de qualidade, podendo variar entre o grau 1, correspondendo aos excelentes, cujo estadio de desenvolvimento corresponde à sua

idade, e o grau 4, englobando os embriões degenerados ou com elevado atraso no seu desenvolvimento.

2.5.6.1. Preparação das monocamadas de células da granulosa

Os ovários destinados à colheita de células da granulosa, em número variando entre 8 e 10, são transportados do matadouro até ao Laboratório em meio PBS arrefecido a 4°C, preparado como se refere nos Anexo A.

Durante a aspiração dos folículos, o líquido obtido é depositado em tubos esterilizados de fundo cónico contendo meio frio de recolha e lavagem de oócitos (W1). Após algum repouso, procede-se então à decantação e eliminação do sobrenadante e à observação do resíduo com lupa (Olympus, SZ60). Os oócitos são rejeitados, deixando-se apenas presentes as células da granulosa. Este resíduo sofre então uma centrifugação a 500 g durante 5 minutos, obtendo-se um eluato que se reconstitui com meio de cultura de oócitos (MC de oócitos), numa diluição de 1:20.

A suspensão celular assim obtida é homogeneizada com seringa de 1 ml adaptada a agulha de 19-g, sendo dela retirados 20 µl para determinação da concentração das células da granulosa em câmara de Neubauer, assim como da sua viabilidade por coloração vital com azul de Tripán. A concentração é ajustada para uma diluição final de 1×10^6 células mL⁻¹, de acordo com a fórmula descrita para a determinação da concentração dos espermatozóides.

Colocam-se em seguida gotas de 100 µl da diluição anterior em placas de cultura, submersas em óleo mineral. As placas são transferidas para a estufa incubadora a 39°C em atmosfera com 5% de CO₂ e humidade saturada. Cerca de 48 horas após o início da cultura, existe já uma confluência das células da granulosa formando monocamadas, aptas a receber os zigotos às 24 horas após a inseminação.

2.5.7. Técnica de coloração vital e nuclear de blastócitos por epifluorescência (método baseado no de Purcel *et al.*, 1985 e modificado por Yang Zhihong, gentilmente cedido pelo Prof. Raymond Wright).

A. Preparação das lâminas para microscopia

1. As lâminas de vidro (75x24 mm) previamente guardadas numa solução de álcool (25%) e éter (75%), são lavadas com água tépida desionizada. Secar na estufa.
2. Prepara-se uma solução com 1 parte de Prosil (Specialist Chemicals) e 100 partes de água desionizada.
3. As lâminas são submersas na solução de Prosil durante 10 segundos.
4. Lavar de novo com solução de água desionizada e secar na estufa.

B. Montagem dos embriões para coloração

1. Escrever numa extremidade da lâmina a identificação do(s) embrião(ões) (tratamento# / embrião#, etc.)
2. Pipetar os embriões (1-10) em 10 µl de meio para as lâminas

C. Coloração dos embriões

1. Preparar a solução mãe de Hoechst 33342 (Sigma Cat nº B2261), na concentração de 1mg/ml de água. A solução de trabalho do Hoechst é preparada fresca para cada sessão misturando 0,75 ml de uma solução de citrato de sódio a 2,3%, 0,25 ml de etanol e 10 µl da solução mãe de Hoechst.
2. Preparar uma solução de coloração vital a 0,05% de azul tripan dissolvido em citrato de sódio a 2,3%.
3. Colocar 10 µl da solução a 0,05% de tripan-citrato na lâmina sobre os embriões durante 30-50 segundos.
4. Remover a solução de tripan-citrato sem deixar secar os embriões.
5. Pipetar 10 µl da solução de trabalho de Hoechst sobre os embriões e colocar as lâminas numa estufa de incubação a 39° C, dentro de caixas refractárias à luz, durante 12-15 minutos (o tempo de coloração é crítico).
6. Remover a solução de Hoechst, deixando os embriões nas lâminas e colocando rapidamente sobre eles as lamelas.
7. Armazenar as lâminas numa caixa de arquivo ou proceder à contagem celular de imediato. Se houver armazenamento, evitar a exposição à luz. A observação deve ser feita em microscópio equipado com epifluorescência.

Notas: Colocar os embriões sobre as lâminas utilizando um pequeno volume de meio. Adicionar azul tripan e corar. Remover o tripan e colocar rapidamente o corante Hoechst para impedir a desidratação dos embriões. O corante Hoechst contém etanol devendo portanto utilizar-se um volume adequado para prevenir a evaporação completa antes da sua remoção. A evaporação do etanol pode conduzir a um aumento da concentração do corante e conseqüentemente provocar uma coloração exagerada dos embriões. Após a coloração é necessário manter os embriões na obscuridade para se obter uma melhor fluorescência dos núcleos. Os embriões submetidos ao azul tripan aderem suavemente ao vidro da lâmina. O Hoechst provoca uma fixação mais forte dos embriões ao vidro. É absolutamente necessário manter as soluções corantes estéreis pois as bactérias também são excitadas pela fluorescência.

2.6. Doseamentos radioimunológicos (RIA)

2.6.1. Progesterona

As concentrações de progesterona serão medidas por radioimunoensaio em fase sólida a partir de 50 µl de cada amostra de plasma correndo em duplicado, de acordo com o protocolo da ¹²⁵I-Progesterone Coatria RIA Kit, da bioMérieux, tal como descrito previamente (Vasques, 1990). A contagem das fracções ligadas será efectuada em contador de cintilação gama, durante 1 minuto/amostra.

Para controlo de qualidade do método serão calculadas as variações intra- e inter-ensaio. A variação intra-ensaio será calculada a partir da média dos coeficientes de variação dos duplicados das amostras desconhecidas, e a variação inter-ensaio a partir da média dos coeficientes de variação de uma mesma amostra com concentração conhecida correndo em diferentes sessões.

2.6.2. bPSPB

A bPSPB será igualmente doseada por RIA em sistema homólogo por técnica de fase sólida, com separação por segundo anticorpo, segundo método utilizado no Laboratório de doseamentos hormonais de UNCEIA - Maisons Alfort - França (Humblot *et al.* (1988), sendo o limite de detecção de 0,01 ng/ml.

De acordo com as concentrações esperadas para cada fase da gestação, as amostras para doseamento de bPSPB serão diluídas com soro de vaca não gestante que variando de zero (não diluída), no início da gestação, a 1:200 no fim da gestação.

O controlo de qualidade dos doseamentos será avaliado através da variação intra- e inter-ensaio, usando o método descrito para a progesterona.

2.6.3. Lactogénio placentário bovino (bPL)

O lactogénio placentário bovino será doseado por radioimunoensaio em amostras de plasma sanguíneo, utilizando kits comerciais da Diagnostic Products Corporation 5700 West 96th Street Los Angeles, CA. As amostras correrão em duplicado e os controlos de qualidade do método serão efectuados de acordo com o descrito anteriormente para a progesterona (coeficientes de variação intra- e inter-ensaio).

2.7. Medições ecográficas do feto

Para a medição dos fetos até aos 100 dias de gestação será utilizado um “scanner” de modo B em tempo real de ultrasonografia equipado com uma sonda rectal linear de 6-8 MHz. Todas as operações deverão ser realizadas pelo mesmo operador aos 40, 55, 70, 85 e 100 dias de gestação.

Será anotada a localização do feto (corno uterino esquerdo ou direito), a vitalidade fetal através dos batimentos cardíacos e a medição da curvatura dorsal fetal entre a cabeça (occipital) e a inserção da cauda (crown ramp - CR).

A evolução do comprimento da curvatura fetal, nos fetos vivos, servirá para a determinação do índice de crescimento dos fetos até aos 100 dias (mm/dia).

A medição da curvatura aos 115 dias, e a mesma medição realizada nos vitelos imediatamente após o nascimento, servirão para apreciar o índice de crescimento entre os 115 dias e o parto (mm/dia).

Estes dois índices de crescimento do feto, corrigidos para a duração da gestação, serão comparados entre os animais dos diferentes grupos e genótipos, bem como as suas correlações com o índice de produção das concentrações de bPSPB (ng/dia), bPL (ng/ml), peso ao nascimento (kg) e índice de crescimento dos vitelos até aos 100 dias pós-parto (g/dia). O significado estatístico das correlações e das comparações efectuadas será certificado respectivamente pelo teste t de Student e por análise de variância, para um nível de 5%.

3. Meios necessários

3.1. Equipamento

- a) Para as diferentes fases de culturas celulares (maturação de oócitos, preparação do sémen, capacitação espermática, fertilização, cultura de embriões e cultura das células de granulosa e BOEC) serão necessárias duas estufas incubadoras com programação e controlo automático da temperatura, humidade e atmosfera de CO₂.
- b) Para todas as manipulações de células, oócitos, sémen, embriões e fabricação dos meios de cultura, serão necessárias bancadas montadas em câmaras de fluxo laminar, tendo em vista a manutenção asséptica das áreas de trabalho.
- c) Lupas estereoscópicas com zoom para a observação e manipulação de células vivas (oócitos, embriões e co-culturas celulares).
- d) Microscópio invertido equipado com contraste de fase e fonte de excitação para fluorescência para observação e manipulação de células vivas a grande aumento e coradas pela técnica Hoechst 33342.
- e) Microscópio equipado com contraste de fase para observação de células coradas a grande aumento (vitalidade das co-culturas celulares e do sémen e concentração celular).
- f) Fotómetro programado para medição da concentração espermática.
- g) Osmómetro para leitura da pressão osmótica dos meios de cultura.
- h) Potenciómetros para medição do pH dos meios de cultura.
- i) Agitadores tipo vórtex.
- j) Banhos-maria com regulação termostática para acondicionamento dos meios de cultura durante a manipulação.
- k) Sistema MilliQ de ultrafiltração da água a utilizar em meios de cultura.
- l) Centrífuga refrigerada para centrifugação de amostras sanguíneas.
- m) Centrífuga para centrifugação do sémen durante o seu processamento para a fertilização *in vitro*.

- n) Balança de precisão com limiar de pesagem até 0,0001 g, para a preparação dos meios de cultura.
- o) Aparelho de congelação de embriões utilizando álcool metílico com diferentes rampas de programação térmica até -36°C .
- p) Embriões e sémen serão mantidos congelados em contentores de azoto líquido apropriados.
- q) Para as análises hormonais será utilizado um contador de radioisótopos (RIA).
- r) Para a medição dos fetos durante a gestação por ultrasonografia será utilizado um ecógrafo munido de sonda linear endorectal veterinária de 6.0/8.0 MHz.
- s) Para a colheita de oócitos *in vivo* será utilizado um equipamento constituído por ecógrafo, sonda endovaginal sectorial multi angular (5.0/7.7 MHz) e aparelho de biópsia de ovários munido com bomba de vácuo.

3.2. Material descartável:

- a) Tubos de ependorf para armazenamento de amostras congeladas e manipulações diversas durante a produção de embriões.
- b) Seringas de 1 ml com agulhas 19 G para aspiração de oócitos
- c) Seringas de 1 ml com micropipetas de vidro para a manipulação de oócitos e embriões.
- d) Placas de Petri em poliestireno para cultura de oócitos (35 mm), células em monocamada (50 mm) e embriões (60 mm)
- e) Placas para a fertilização *in vitro*.
- f) Filtros descartáveis de 0,22 e 0,44 μm de porosidade para filtração dos meios de cultura.
- g) Tubos de ensaio em poliestireno com fundo cónico para a manipulação de oócitos, espermatozóides e células da co-cultura.
- h) Seringas heparinizadas para colheita de sangue (10 ml)

- i) Palhinhas de cassou para acondicionamento dos embriões (congelamento e transferência).
- j) Sémen congelado de um touro de cada uma das raças a utilizar na fertilização *in vitro* (*Holstein*, *Mertolenga* e *Alentejana*), na inseminação artificial e na produção de embriões por superovulação (*Mertolenga* e *Alentejana*).
- k) Catéteres de Foley e filtros para a recolha e selecção de embriões após superovulação.

3.3. Animais, embriões e calendarização de actividades

- a) Selecção de fêmeas de raça *Holstein* em matadouro para colheita de ovários *post-mortem* (projecto1).
- b) Selecção em matadouro de fêmeas das raças *Mertolenga* e *Alentejana* para colheita de ovários *post-mortem* (projecto 2).
- c) Núcleo de vacas da raça *Holstein* para servirem de receptoras aos embriões produzidos no projecto 2 (200 vacas).
- d) Núcleo de vacas de raça *Alentejana* e *Mertolenga* para servirem de receptoras aos embriões de raça homóloga (IVP e MOET) e serem submetidas a inseminação artificial no âmbito do projecto 3.

No Projecto 1 (tabela 7), considera-se desejável uma produção final de 500 embriões de dia 8 por cada grupo considerado, representando um total de 3000 embriões. Se considerarmos um rendimento médio próximo ao que normalmente tem sido conseguido no nosso laboratório, será possível recolher 7,4 oócitos por ovário, dos quais 15% serão rejeitados e 85% dos cultivados atingirão a maturação. Dos oócitos maturados será possível fertilizar 70% dos quais somente 20% atingirão o estadio de embriões transferíveis em D8. Assim, para produzir 3000 embriões serão necessários cerca de 15000 oócitos fertilizados, 21428 oócitos maturados, 25209 oócitos cultivados e 29657 oócitos recolhidos de 4006 ovários, a que correspondem 2003 fêmeas abatidas. Se partirmos do princípio que é razoável recolher 60 ovários por semana, o trabalho poderá ser concretizado em 66 semanas. Assumindo que o

laboratório de FIV pode laborar 44 semanas por ano, este projecto necessitaria de um ano e seis meses para estar terminado.

Tabela 7 - Necessidades em animais e embriões para os três projectos (por cada genótipo embrionário para os projectos 2 e 3).

	Factor de Divisão	1º projecto (n)	2º projecto (n)/raça		3º Projecto(n)/raça	
			1º estudo	2º estudo	IVP	MOET**
Partos – vitelos	0.4			120	60	60
Embriões transferidos.	0.7			300	150	150
Embriões D8	0.2	3000	400*+ 430		214	
Oócitos clivados	0.7	15000	4150		1071	
Oócitos maturados	0.85	21428	5928		1530	
Oócitos cultivados	0.85	25210	6975		1800	
Oócitos recolhidos	7.4	29658	8205		2118	
Ovários recolhidos	2	4008	1108		286	
Vacas abatidas	30	2003	554		143	
Semanas úteis de trabalho		66.7	18.5		5	
Tratat. Superovulatórios						60

* 400 embriões serão utilizados para os estudos de coloração com Hoechst (100 por grupo) e 430 serão congelados e utilizados no 2º estudo.

** 60 superovulações x 2,5 embriões transferíveis = 150 embriões transferidos x 0,40 = 60 partos

Para o 2º projecto (tabelas 7 e 8), será desejável obter pelo menos 30 vitelos nascidos para cada genótipo embrionário considerado (ALxAL e MERTxMERT) e por cada grupo (4 grupos), representando um total de 120 nascimentos por genótipo. Partindo do princípio que em efectivos livres de rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR-IPV) e de diarreia bovina (BVD) é possível atingir um índice de 40% de nascimentos após a transferência de embriões produzidos *in vitro*, seria necessário realizar um total de 300 transferências de embriões de cada uma das raças consideradas. Trabalhando no limite e dispondo de um efectivo de 100 fêmeas receptoras para cada genótipo embrionário (total de 200), seria possível obter 240 partos no prazo de 52 meses, realizando transferências de 3 em 3 meses para cada um dos genótipos embrionários, como se apresenta no quadro seguinte. Em três anos será possível obter os 120 vitelos nascidos de cada um dos genótipos embrionários considerados e completar os estudos de crescimento pós-natal.

Tabela 8 - Estudo 2 do 2º projecto: Previsão do nº de vacas gestantes a partir de um efectivo inicial de 100 animais.

	Jan	Abr	Jul	Out	Jan	Abr	Jul	Out	Jan	Abr
Vacas transferidas	50	50	50	40	44	46	20			
Gestações obtidas	20	20	20	16	18	18	8			
Cumulativo de Partos				20	40	60	76	94	112	120

No projecto 3, será necessário obter 60 vitelos nascidos por cada genótipo (30 por grupo) em cada um dos métodos de produção de embriões (IVP e MOET). As necessidades para cada um dos métodos apresentam-se na tabela 7. Para o método MOET e de acordo com resultados previamente obtidos nestas raças (Lopes da Costa, 1995), só se conseguem obter 2,5 embriões transferíveis por cada tratamento de superovulação, o que implica a realização de 60 tratamentos superovulatórios em cada uma das raças para se conseguirem transferir 150 embriões.

Relativamente à técnica IVP e à semelhança do 2º estudo do 2º Projecto, será possível obter 60 vitelos nascidos para cada um dos genótipos embrionários considerados e completar os estudos de crescimento pós-natal em 24 meses (48 meses para os dois genótipos). Para a técnica MOET, a somar a este prazo, se se superovularem 4 vacas em cada sessão e se realizarem duas sessões por mês, temos de considerar um período adicional de cerca de 8 meses para a produção de embriões (16 meses para as duas raças).

Na sequência das necessidades para a concretização das tarefas anteriormente descritas, na tabela 9 encontra-se resumida a projecção temporal das actividades dos três projectos, prevendo-se que em 9 e 6 meses anos é possível concluir o programa de investigação proposto.

Tabela 9 – Projecção temporal das actividades dos três projectos (i = produção *in vitro* de embriões; e = tratamento estatístico; t = sincronização, transferência de embriões, gestação e pós-parto; s = tratamentos de superovulação; d = doseamentos hormonais)

Anos		1		2		3		4		5		6		7		8		9		9,5
Meses		6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90	96	102	108	114
1º		i	i	i	e															
2º	1				i	i	i	e												
	2					t	t	t	t	t	t	t	t	t	e	e				
3º		s	s	s				i	i	t	t	t	t	t	t	t	t	e		
Todos			d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	e

3.4. Meios Humanos

A afectação do pessoal a este programa de investigação reparte-se pelas diferentes fases do trabalho proposto. A coordenação deverá ser efectuada por um elemento da carreira de investigação com experiência na implementação e gestão de projectos nesta área de especialização.

Para a produção *in vitro* de embriões (Projecto 1 e Estudo 1 do Projecto 2 e Projecto 3) é necessária a intervenção de pelo menos 3 elementos da carreira de investigação e 2 técnicos profissionais.

Para as acções relacionadas com a sincronização dos ciclos, superovulação e recolha de embriões, transferência de embriões, acompanhamento da gestação, parto e pós-parto, é necessária a intervenção de pelo menos 3 técnicos da carreira de investigação, 1 técnico superior (Médico Veterinário), 1 técnico de produção animal, 3 técnicos profissionais e 3 tratadores de animais.

Para a execução dos doseamentos hormonais, um técnico da carreira de investigação, 1 técnico superior e 1 técnico profissional.

Para o apoio administrativo e gestão de recursos é necessária a colaboração de 1 técnico administrativo.

Carreira	nº	Índice do tempo integral dedicado ao programa
Investigação	5	$5 \times 0,80 = 4,00$
Técnico Superior	2	$0,80 + 0,40 = 1,80$
Técnico de produção animal	1	0,80
Técnico Profissional	4	$4 \times 0,80 = 3,20$
Tratador de animais	3	$3 \times 0,80 = 2,40$
Carreira administrativa	1	0,40
Total	15	12,80

3.5. Encargos financeiros

Apresentamos em seguida os encargos financeiros do programa proposto, excluindo os relacionados com o pagamento de salários e amortização de infra-estruturas. Parte-se do princípio que são compromissos assumidos pelas instituições de investigação do Estado como meios funcionais essenciais investidos numa actividade de utilidade pública, constituindo o próprio programa proposto uma mais valia no aproveitamento funcional dos meios humanos e infra-estruturais já existentes. Recorde-se que a quantificação financeira destes meios também é excluída dos orçamentos nos programas europeus de financiamento para a investigação.

Os equipamentos de laboratório são aqui incluídos tendo em consideração um período de renovação a 5 anos, pelo que o seu custo será multiplicado por um factor igual a 1,9. Os custos com a alimentação das vacas não foram incluídos por se considerar que eles serão amortizados pelas receitas geradas com a venda dos vitelos, o leite produzido pelo núcleo das vacas *Holstein* e pela alienação das vacas no final do programa de investigação.

Custos previstos para os 9,5 anos de duração do programa	
Descrição	Escudos x 10 ³
Despesas de Capital	
2 estufas CO2	11 400
Congelador de embriões	5 700
Osmómetro	2 280
Potenciómetro de pH	950
Ecógrafo + sonda	7 600
Microscopia	3 800
Adaptação de estruturas	2 000
<i>Total (despesas de capital)</i>	<i>33 730</i>
Despesas Correntes	
Animais	11 500
Sanidade animal	1 920
Produção de embriões IVP	1 800
Aquisição de serviços	2 000
Deslocações e reuniões	2 500
Gastos de secretaria	500
Comunicações	1 000
Produção de embriões por superovulação	3 000
Sincronização dos ciclos	2 160
Doseamentos hormonais	4 320
Outros reagentes e descartáveis	1 000
<i>Total (despesas correntes)</i>	<i>31 700</i>
Total	65 430

4. Considerações finais

O presente programa propõe-se estudar a influência da progesterona e do tipo de co-cultura celular incorporados precocemente, sobre o crescimento embrionário *in vitro* e subsequente desenvolvimento do feto e dos vitelos, utilizando duas raças de bovinos nacionais de pequeno e grande porte em adulto (*Mertolenga* e *Alentejana*). A influência da técnica de produção *in vitro* de embriões sobre o desenvolvimento fetal e peso ao nascimento será igualmente caracterizada para estas duas raças nacionais. Simultaneamente, serão estabelecidas relações entre o tipo de desenvolvimento embrionário, fetal e pós-natal e a produção de lactogénio placentário bovino (bPL) e de proteína específica da gestação nos bovinos (bPSPB) nas diferentes situações experimentais estabelecidas, no sentido de se saber se estas hormonas e proteínas aparecem associadas ao síndrome de vitelos pesados. O material genético embrionário criopreservado poderá vir a servir para estudos sobre eventuais alterações precoces dos genes que no futuro venham a ser identificados como responsáveis pelas alterações produzidas pela técnica, suplementação de progesterona e tipo de co-cultura na expressão do crescimento embrionário e fetal.

5. Referências Bibliográficas

- Anthony, R.V., Bellows, R.A., Short, R.E., Staigmiller, R.B., Kaltenbach, C.C. e Dunn, T.G. 1986. Fetal growth of beef calves: II. Effects of sire on prenatal development of the calf and related placental characteristics. *J. Anim. Sci.*, **62**: 1375-1387.
- Anthony, R.V., Pratt, S.L., Liang, R. e Holland, M.D. 1995. Placental-Fetal Hormonal Interactions: Impact on Fetal Growth. *J. Anim. Sci.*, **73**: 1861-1971.
- Baker, J., Liu, J.-P., Robertson, E.J. e Efstratiadis, A. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, **75**: 73-82.
- Behboodi, E., Anderson, G.B., BonDurant, R.H., Cargill, S.L., Kreuscher, B.R., Medrano, J.F. e Murray, J.D. 1995. Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*, **44**: 227-232.
- Burfening, P.J., Kress, D.D., Friedrich, R.L., e Vaniman, D.D. 1978. Phenotypic and genetic relationships between calving ease, gestation length, birthweight and preweaning growth. *J. Anim. Sci.*, **47**: 595- 600.
- Cavaco Gonçalves, S., Marques, C.C., Stöckemann, K., Wang, W., Horta, A.E.M. (1997). Influence of an antiprogestin (onapristone) on *in vivo* and *in vitro* fertilization. *Anim. Reprod. Sci.*, **46**: 55-67.
- DeChiara, T.M., Efstratiadis, A. e Robertson, E.J. 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature (Lond.)*, **345**: 78-80.
- DeChiara, T.M., Robertson, E.J. e Efstratiadis, A. 1991. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, **64**: 849-859.
- Echternkamp, S.E. 1992. Fetal development in cattle with multiple ovulations. *J. Anim. Sci.*, **70**: 2309-2321.
- Eley, R.M., Thatcher, W.W., Bazer, F.W., Wilcox, C.J., Becker, R.B., Head, H.H. e Adkinson, R.W. 1978. Development of the conceptus in the bovine. *J. Dairy Sci.*, **61**: 467-473.
- Farin, P.W. e Farin, C.E. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol. Reprod.*, **52**: 676-682.
- Farin, C.E., Farin, P.W. e Mungal, S.A. 1997a. Maternal insulin-like growth factor-I (IGF-I) and development of in vivo- and in vitro-derived bovine fetuses. *Theriogenology*, **47**: 318.
- Farin, P.W., Farin, C.E. e Mungal, S.A. 1997b. Measurements of bovine fetuses and placentas at 63 days after transfer of embryos produce in vivo or in vitro. *Theriogenology*, **47**: 319.
- Ferrel, C.L. 1991. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: I. Growth of tissues of the gravid uterus. *J. Anim. Sci.*, **69**: 1945-1953.
- Garrett, J.E., Geisert, R.D., Zavy, M.T. e Morgan, G.L. 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J. Reprod. Fertil.*, **84**: 437-447.
- Garry, F.B., Adams, R., McCann, J.P. e Odde, K.G. 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology*, **45**: 141-152.
- Gluckman, P.D. 1986. The role of pituitary hormones, growth factors and insulin in the regulation of fetal growth. In: *Oxford Review of Reproductive Biology*, J.R. Clarke (ed), Clarendon Press, Oxxford, UK, pp. 1-60.

- Gore, M.T., Young, R.B., Claeys, M.C., Chromiak, J.A., Rahe, C.H., Marple, D.N., Hough, J.D., Griffin, J.L. e Mulvaney, D.R. 1994. Growth and development of bovine fetuses and neonates representing three genotypes. *J. Anim. Sci.*, **72**: 2307-2318.
- Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCauley, A.D., Mower, S.A., Neely, B., Shuey, L.S., Stokes, J.E. e Trimmer, S.A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, **43**: 141-152.
- Horta, A.E.M., Costa, C.M.S.G., Robalo Silva, J. e Rios Vasques, M. 1986. Possibility of reducing the luteolytic dose of cloprostenol in cyclic dairy cows. *Theriogenology*, **25**: 291-301.
- Horta, A.E.M., Marques, C.M., Vasques, M.I. e Leitão, R.M. 1992. Effect of inducing calvings on calf birth weight. *Proceedings do 12th International Congress on Animal Reproduction*, The Hague, The Netherlands, 23-27 Aug, poster 267, pp. 895-897.
- Horta, A.E.M., Marques, C.C., Vasques, M.I., Leitão, R.M. e Vaz Portugal, A. 1993. Indução de gestações gemelares em vacas de carne por transferência de embriões produzidos *in vitro*. *Proceedings do 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal*, Sociedade Portuguesa de Reprodução Animal (Ed.), Luso-Portugal, **II Vol.**, pp. 163-172.
- Horta, A.E.M., Marques, C.C., Baptista, M.C., Vasques, M.I., Pereira, R.M., Duarte, A.J.F., Lopes da Costa, L.F. 1996. *Desenvolvimento de técnicas de produção in vitro de embriões de bovino e ovino*. Relatório final do projecto nº PBIC/C/AGR/1477/92/JNICT.
- Holm, P., Walker, S.K., Peterson, B.A., Ashman, R.J. e Seamark, R.F. 1994. In vitro vs in vivo culture of ovine IVM/IVF ova: effect on lambing. *Theriogenology*, **41**: 217.
- Humblot, P., Camous, S., Martal, J., Charleroy, J., Jeanguyot, N., Thibier, M., Sasser, R.G. (1988a). Pregnancy Specific Protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. *J. Reprod. Fertil.*, **83**: 215-223.
- Hunter, H.G. e Moor, R.M. 1987. Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acid and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, **70**: 1646-1651.
- Keefer, C.L., Stice, S.L. e Matthews, D.L. 1994. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol. Reprod.* **50**: 935-939.
- Kleemann, D.O., Walker, S.K. e Seamark, R.F. 1994. Enhanced fetal growth in sheep administered progesterone during the first three days of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, **102**: 411-417.
- Kruip, Th.A.M., Pieterse, M.C., van Baneden, Th.H., Vos, P.L.A.M., Wurth, Y.A. e Taverne, M.A.M. 1991. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. *The Veterinary Record*, March 2: 208-210.
- Kruip, Th.A.M. e den Daas, J.H.G. 1997. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, **47**: 43-52.
- Leighton, P.A., Ingram, R.S., Eggenschwiler, J., Efstratiadis, A., e Tilghman, S.M. 1995. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent manose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Devel.*, **8**: 2953-2963.
- Leighton, P.A., Saam, J.R., Ingram, R.S. e Tilghman, S.M. 1996. Genomic imprinting in mice: its function and mechanism. *Biol. Reprod.*, **54**: 273-278.
- Liu, J.-P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J. e Efstratiadis, A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, **75**: 59-72.

- Lopes da Costa, L.F. 1995. Estudo sobre a utilização das raças bovinas autóctones portuguesas Alentejana e Mertolenga como dadoras e receptoras de embriões. Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Lu, K.H., Gordon, I., Gallagher, M. e McGovern, H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *Vet. Rec.*, **121**: 159-160.
- Marques, C.C., Pereira, R.M., Vasques, M.I., Baptista, M.C. e Horta, A.E.M. (1997). Influência da refrigeração de ovários dadores na produção de embriões bovinos e cultura de células da granulosa *in vitro*. *Proceedings do 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, 3-6 de Julho, Estoril, II, pp. 136-141.
- Marques, C.C. 1998. Contribuição ao estudo da maturação de oócitos e cultura de embriões bovinos *in vitro*. *Dissertação apresentada a concurso para Investigador Auxiliar*, EZN-INIA, Vale de Santarém.
- Merton, J.S., van Wagtenonk-de Leeuw, A.M. e den Daas. 1998. Factors affecting Birthweight of IVP calves. *Theriogenology*, **49**: 293.
- Numabe, T., Oikawa, T., Satoh, H., Takada, N. e Horiuchi, T. 1997. Birthweights of calves conceived by transfer of Japanese Black Cow embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*, **47**: 378.
- Numabe, T., Oikawa, T., Kikushi, T. e Horiuchi, T. 1999. Birthweights of calves conceived by transfer of Japanese Black cow embryos produced *in vitro* by co-culture with cummulus cells. *Theriogenology*, **51**: 327.
- Patel, O.V., Domeki, I., Sasaki, N., Takahashi, T., Hirako, M., Sasser, R.G., e Humblot, P. 1995. Effect of fetal mass, number and stage of gestation on pregnancy-specific protein B concentrations in the bovine. *Theriogenology*, **44**: 827-833.
- Patel, O.V., Hirako, M., Takahashi, T., Sasaki, N. e Domeki, I. 1996. Plasma bovine placental lactogen concentration throughout pregnancy in the cow; relationship to stage of pregnancy, fetal mass, number and postpartum milk yield. *Domest Anim Endocrinol*, **13(4)**: 351-359.
- Pereira, R.M., Vasques, M.I., Marques, C.C., Baptista, M.C. e Horta, A.E.M. 1997. Efeito do soro de vacas em cio superovuladas, sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos e a síntese de progesterona por monocamadas de células da granulosa. *Proceedings do 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, Sociedade Portuguesa de Reprodução Animal (Ed.), Estoril-Portugal, **Vol II**, 128-135.
- Pieterse, M.C., Vos, P.L.A.M., Kruip, Th.A.M., Wurth, Y.A., van Beneden, Th.A., Willemse A.H. e Taverne, M.A.M. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, **35**: 19-24.
- Prior, R.L. e Laster, D.B. 1979. Development of the bovine fetus. *J. Anim. Sci.*, **48**: 1546-1553.
- Reinders, J.M.C., Paauw, M.J.G., Hazeleger, W., van Wagtenonk-de Leeuw, A.M. e Kemp, B. 1998. Is the large calf syndrome related to pregnancy diabetes? *Theriogenology*, **49**: 297.
- Schmidt, M., Greve, T., Avery, B., Beckers, J.F., Sulon., J. e Hansen, H.B. 1996. Pregnancies, Calves and calf viability after the use of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, **46**: 527-539.
- Seidel, G.E. Jr. 1992. Overview of cloning mammals by nuclear transplantation. In: Seidel, G.E. Jr. (ed), *Proceedings, Symposium on cloning mammals by Nuclear Transplantation*. Colorado State University, pp 1-4.

- Simon, L., Bungartz, L., Rath, D. e Niemann, H. 1993. Repeated bovine oocyte collection by means of a permanently rinsed ultrasound guided aspiration unit. *Theriogenology*, **39**: 312
- Sinclair, K.D., Broadbent, P.J. e Dolman, D.F. 1995. In vitro produced embryos as a means of achieving pregnancy and improving productivity in beef cows. *Animal Science*, **60**: 55-64.
- Stacchezzini, S., Fabaro, P., e Cremonesi, F. 1997. Field experiences with the transfer of in vitro or in vivo derived Piedmontese embryos in holstein recipients. *Theriogenology*, **47**: 381.
- StatSoft Inc., 1995. STATISTICA for Windows (computer program manual). Tulsa, OK.
- Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S. *et al.* 1994. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*, **372**: 182-186
- Thompson, J.G., Simpson, A.C., Pugh, P.A., McGowan, L.T., James, R.W., Berg, D.K., Payne, S.R. e Tervit, H.R. 1992. Effects of glucose level in culture medium on survival of in vitro cultured sheep embryos following transfer to recipient ewes. *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.*, **52**: 255-256.
- Vasques, M.I. (1990). Relatório de Atividades. Adenda. EZN/INIA. Vale de Santarém.
- Vasques, M.I., Horta, A.E.M., Marques, C.C., Sasser, R.G. e Humblot, P. 1995. Levels of bPSPB throughout single and twin pregnancies after AI or transfer of IVM/IVF cattle embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, **38**: 279-289.
- Vasques, M.I., Marques, C.C., Pereira, R.M., Baptista, M.C. e Horta, A.E.M. 1998. Efeito luteotrófico de embriões bovinos e de diferentes tipos de soros sobre células da granulosa cultivadas in vitro. *Rev. Port. Ciênc. Veter.*, **93**: 25-30.
- Vasques, M.I. 1998. Concentrações da proteína-B específica da gestação (bPSPB) durante a gestação e pós-parto em vacas de raça Alentejano. *Dissertação apresentada a concurso para acesso a Investigador Auxiliar*, EZN-INIA, Vale de Santarém.
- Walker, S.K., Heard, T.M. e Seamark, R.F. 1992. In vitro culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives. *Theriogenology*, **37**: 111-126.
- Walker, S.K., Hartwich, K.M. e Seamark, R.F. 1996. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology*, **45**: 111-120.
- Wang, W.L. 1991. Factors affecting metabolic requirements and *in vitro* culture of bovine embryos. *Ph.D. Thesis*, National University of Ireland, Dublin.
- Willadsen, S.K., Janzen, R.E., McAlister, R.J., Shea, B.F., Hamilton, G., e McDermand, D. 1991. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology*, **36**: 161-170.
- Wilson, J.M., Williams, J.D., Bondioli, K.R., Looney, C.R., Whesthusin, M.E. e McCalla, D.F. 1995. Comparison of birth weight and characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer and natural mating. *Anim. Reprod. Sci.*, **38**: 73-83.
- Wilmot, I. e Sales, D.I. 1981. Effect of an asynchronous environment on embryonic development in the sheep. *J. Reprod. Fertil.*, **61**: 179-184.
- Young, L.E., Tregaskes, L.D., Butterwith, S.C., Sinclair, K.D. e Wilmot, I. 1995. Advancing the uterine environment of early embryos by asynchronous transfer for 3 days affects foetal size at day 21. *J. Reprod. Fertil.*, **15**: 18.

Young, L.E., Butterwith, S.C., Sinclair, K.D., Maxfield, E.K., e Wilmut, I. 1997. IGF2 gene expression in ovine fetal development. *Theriogenology*, **47**: 385.

ANEXOS

1. Constituição dos meios de cultura para a produção *in vitro* de embriões (protocolos utilizados no Departamento de Reprodução da EZN, descritos em Marques, 1998).

Os meios necessários para a produção *in vitro* de embriões bovinos no Laboratório de Embriologia do Departamento de Reprodução da Estação Zootécnica Nacional (EZN) são preparados obedecendo a rigorosas regras de assépsia. Para tal, os produtos utilizados para a sua confecção são manuseados dentro de câmaras de fluxo laminar horizontal com a ajuda de material de vidro previamente esterilizado, sendo a água necessária à diluição desses produtos obtida comercialmente e testada para a cultura de embriões. Antes do seu acondicionamento em frigorífico, durante um prazo não superior a duas semanas, os meios são esterilizados com filtros de 0,22 ou 0,44 μm de porosidade (Millipore). As condições de temperatura dentro do Laboratório são mantidas normalmente dentro de valores constantes, próximos dos 25°C.

1.1. Meio para transporte e lavagem de ovários (PBS)

Este meio pode ser preparado de 2 a 3 dias antes da sua utilização. À solução fosfato-salina tamponizada de Dulbecco (PBS, Gibco Laboratories, Life Technologies Inc., Gent, Bélgica, ref. 14040-91) adicionam-se 0,05 mg mL^{-1} de sulfato de kanamicina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, ref. K-4000) e 0,15 % (p/v) de albumina sérica bovina (BSA; Fracção V, Sigma, ref. A-7888).

Constituição básica da solução fosfato-salina tamponizada de Dulbecco (Gibco) para transporte e lavagem de ovários.

Constituintes (Sais Inorgânicos)	g L^{-1}
CaCl_2 (anidro)	0.10
KCl	0.20
KH_2PO_4	0.20
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.10
NaCl	8
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.16

1.2. Meio para recolha e lavagem dos oócitos (W1)

O meio básico utilizado para a recolha, lavagem e triagem dos oócitos primários é o TCM 199 (Tissue Culture Medium 199, Gibco, ref. 22340-020) constituído por sais de Earle, L- glutamina e 25 mM de Hepes, suplementado com 5% de soro de vaca em cio superovulada (SOCS, confeccionado no próprio laboratório) e 2% de uma solução antibiótica (v/v; Sigma, ref. P-4333), correspondente a 100 ui mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina. O pH deste meio varia entre 7,3 e 7,4 e a osmolaridade situa-se na gama dos 283 mOsm. O meio final é esterilizado através de filtros Minisart (Sartorius, ref. 16534-K) de 0,22 µm e equilibrado numa atmosfera de 5% CO₂ com o máximo de humidade e à temperatura de 39° C, pelo menos 2 horas antes da sua utilização, em estufa incubadora (Nuair, IR autoflow CO₂).

1.3. Meio de cultura de oócitos primários (MC de oócitos)

O meio básico utilizado para a maturação de oócitos no nosso sistema de IVP é também o TCM-199 (Gibco, ref. 22340-020), com sais de Earle, L- glutamina e 25% de Hepes, suplementado com 10% de soro de vaca superovulada (SOCS) e solução antibiótica (100 UI mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina, Sigma, ref. 4333). O seu pH final é de 7,3 a 7,4 e a osmolaridade de 290 mOsm. O meio final é esterilizado com filtros Minisart de 0,22 µm de porosidade e equilibrado em estufa com 5% de CO₂ em ar saturado de humidade a 39° C, pelo menos 2 horas antes da sua utilização. A este meio são adicionadas células da granulosa em suspensão, retiradas da diluição final destas células utilizadas na formação de monocamadas para co-cultura de embriões, na concentração de 3 a 5 × 10⁶ células por ml de meio de cultura (Lu *et al.*, 1987). Em condições de rotina, o nosso sistema não implica a suplementação do meio de maturação com hormonas (LH, FSH e estradiol) ou factores de crescimento (EGF, IGF e outros), por se considerar que estas substâncias são fornecidas pela adição de soro e células da granulosa ao meio.

1.4. Meio de cultura de embriões (MC de embriões)

O meio básico utilizado para cultura de embriões no nosso sistema IVP é também o TCM-199, diluído a 5 % em água testada para a cultura de embriões e obtida comercialmente (Sigma, ref. W-1503), constituído por sais de Earle, L-glutamina e 25% de Hepes, suplementado com 10% de soro de vaca superovulada (SOCS) e solução antibiótica (100 ui mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina; Sigma, ref. 4333). O seu pH é de 7,3 a 7,4 e a osmolaridade de 290 mOsm. O meio é esterilizado por filtros Minisart de 0,22 µm de porosidade e equilibrado em estufa com 5% de CO₂ em ar saturado de humidade a 39° C, pelo menos 2 horas antes da sua utilização.

Meio 199 (Gibco) – Meio básico de cultura de oócitos e embriões

Componentes	mg L⁻¹	Componentes	mg L⁻¹
Sais Inorgânicos		Aminoácidos (cont.)	
CaCl ₂ (anidro)	140.0	L-Glutamina	100.00
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.72	Glicina	50.00
KCl	400.00	L-Histidina HCl · H ₂ O	21.88
KH ₂ PO ₄	60.00	L-Hidroxi prolina	10.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200.00	DL-Isoleucina	40.00
NaCl	7500.00	DL-Leucina	120.00
NaHCO ₂	350.00	L-Lisina · HCl	70.00
Na ₂ HPO ₄ (anidro)	-	DL-Metionina	30.00
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	90.00	DL-Fenilalanina	50.00
Outros Componentes		L-Prolina	40.00
Sulfato de Adenina	10.00	DL-Serina	50.00
Adenosinotri-fosfato (Sal dissódico)	1.00	DL-Treonina	60.00
Ácido Adenílico	0.20	DL-Triptofano	20.00
Colesterol	0.20	L-Tirosina	40.00
Deoxirribose	0.50	L-Tirosina (Sal dissódico)	-
D-Glucose	1000.00	DL-Valina	50.00
Glutatião	0.05	Vitaminas	
Guamina HCl	0.030	Ácido Ascórbico	0.05
HEPES	5958.00	Fosfato de α-Tocoferol (Sal dissódico)	0.01
Hipoxantina	0.30	d-Biotina	0.01
Vermelho de Fenol	20.00	Calciferol	0.10
Ribose	0.50	D-Pantotenato de Cálcio	0.01
Acetato de Sódio	50.00	Cloreto de Colina	0.50
Timina	0.30	Ácido Fólico	0.01
Tween 80®	20.00	i-Inositol	0.05
Uracil	0.30	Menadiona	0.01
Xantina	0.30	Niacina	0.025
Xantina (Sal sódico)	0.30	Niacinamida	0.025
Aminoácidos		Ácido Para-Aminobenzóico	0.05
DL-Alanina	50.00	Piridoxal HCl	0.025
L-Arginina - HCl	70.00	Piridoxina HCl	0.025
DL-Ácido Aspártico	60.00	Riboflavina	0.01
L-Cisteína HCl · H ₂ O	0.11	Tiamina HCl	0.01
L-Cistina	20.00	Vitamina A (acetato)	0.14
DL-Ácido Glutâmico · H ₂ O	150.00		

1.5. Meio de lavagem dos oócitos após a maturação (W2; Wang, 1992)

Este meio, também denominado meio de Tyrode modificado ou meio TALP por derivar do meio de Tyrode adicionado de Albumina, Lactato e Piruvato, é utilizado para a lavagem dos oócitos secundários, já sujeitos a maturação. A sua esterilização é feita por filtração através de filtros Minisart de 0.22 µm de porosidade e equilibrado pelo menos 2 horas antes da utilização em estufa incubadora a 39°C com 5% de CO₂ e máxima humidade.

Constituição do meio TALP para lavagem de oócitos após a maturação.

Constituintes	ml 100 mL ⁻¹	g 100 mL ⁻¹
NaCl		0,6660
Kcl		0,0238
NaHCO ₃		0,0168
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O		0,0062
Lactato de sódio	0,1600	
MgCl ₂ ·6H ₂ O		0,0100
CaCl ₂ ·2H ₂ O		0,0294
Hepes		0,2400
Vermelho Fenol		0,0010
Piruvato de sódio		0,0055
BSA		0,3000
Glucose		0,1000
Antibiótico*	2	
pH		7,3 - 7,4
Osmolaridade		265 - 270 mOsm.

*solução antibiótica (Sigma, ref. 4333), numa dose correspondente à concentração final no meio de 100 ui mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina.

1.6. Meio de capacitação dos espermatozóides bovinos (CAP; Wang, 1992)

Este meio, também denominado meio de Tyrode modificado (TALP), livre de cálcio, para capacitação de espermatozóides bovinos, é esterilizado por filtração através de filtros Minisart de 0,22 μm de porosidade e equilibrado pelo menos 2 horas antes da sua utilização em estufa incubadora a 39°C com 5% de CO_2 e máxima humidade.

Constituição do meio TALP para a capacitação dos espermatozóides bovinos.

Constituintes	ml 100 mL ⁻¹	g 100 mL ⁻¹
NaCl	0,1600	0,6545
Kcl		0,0200
NaHCO ₃		0,2100
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O		0,0062
Lactato de sódio		
MgCl ₂ ·6H ₂ O		0,0100
Hepes		0,1200
Piruvato de sódio		0,0110
BSA		0,6000
Glucose		0,2500
Cafeína		0,04855
pH		
Osmolaridade		296 mOsm.

1.7. Meio de fertilização dos oócitos bovinos (FERT; Wang, 1992)

Este meio, também denominado meio de Tyrode modificado para fertilização de oócitos bovinos, é esterilizado por filtração através de filtros Minisart de 0.22 μm de porosidade e equilibrado pelo menos 2 horas antes da sua utilização em estufa incubadora a 39°C com 5% de CO_2 e máxima humidade.

Constituição do meio TALP para a fertilização in vitro dos oócitos bovinos.

Constituintes	ml 100 mL ⁻¹	g 100 mL ⁻¹
NaCl		0,6660
Kcl		0,0238
NaHCO ₃		0,2090
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O		0,0062
Lactato de sódio	0,1600	
MgCl ₂ ·6H ₂ O		0,0100
CaCl ₂ ·2H ₂ O		0,0294
Hepes		0,2400
Vermelho Fenol		0,0010
Piruvato de sódio		0,0055
BSA		0,6000
Glucose		0,1000
Heparina		0,0030
Antibiótico*	2	
PHE	4	
pH		7,8
Osmolaridade		300 mOsm.

*solução antibiótica (Sigma, ref. 4333), numa dose correspondente à concentração final no meio de 100 ui mL⁻¹ de penicilina e 100 μg mL⁻¹ de estreptomicina.

1.8. Meio de Penicilamina - Hipotaurina - Epinefrina (PHE)

Este meio, na percentagem de 4%, é incluído no meio de fertilização com o objectivo de estimular a motilidade espermática.

Para preparar 100 ml de PHE adicionam-se:

- A. 30 ml de solução salina (0,9% de NaCl)
- B. 25 ml de 2 mM de penicilamina (Sigma P-4875)
- C. 25 ml de 1 mM de hipotaurina (Sigma H-1384)
- D. 20 ml de 0,25 mM de epinefrina (Sigma E-1635)

Preparação das soluções referidas:

1. Para preparar a solução salina (0,9% de NaCl p/v), adicionam-se 0,9 g de NaCl a 100 ml de água MilliQ.
2. Para preparar a solução de 2 mM de penicilamina adicionam-se 0,00746 g desta substância a 25 ml da solução salina referida no número anterior.
3. Para preparar a solução de 1mM de hipotaurina adicionam-se 2,7275 mg deste aminoácido a 25 ml da solução salina referida no número 1.
4. Para preparar a solução de 0,25 mM de solução de epinefrina adicionam-se 154,7 µl de lactato de sódio e 50 mg de Na₂S₂O₅ a 50 ml de água de MilliQ, ajustando-se em seguida o pH até 4. Desta solução retiram-se 40 ml a que se adicionam 1,832 mg de epinefrina.

Finalmente procede-se à mistura das várias soluções referenciadas.