

MODELO BOVINO DE TREINAMENTO DE MICROMANIPULAÇÃO: BIOTECNOLOGIA FACILITADORA EM REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA

*Beatriz Carolina Schiochet¹, Patrícia Campos Paolozzi², Vania Cibele Minguetti
Câmara³, Carolina Minguetti Câmara¹, Danieli Aparecida Bobbo Moreski², Isabele Picada
Emanuelli⁴*

¹Acadêmicas do Curso de Medicina, Universidade Unicesumar – Unicesumar. Bolsista Bolsista PIBIC/ICETI-UniCesumar.
beatrizschiochet@gmail.com; carolinaminguetticamara@gmail.com

²Mestranda do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Universidade Unicesumar – Unicesumar.
patriciacamposp07@gmail.com; danielibobi@hotmail.com.

³Pesquisadora da Materbaby Reprodução Humana e Genética

⁴Docente do Curso de Medicina, Medicina Veterinária e do Programas de Mestrado em Tecnologias Limpas, UNICESUMAR– PR.
Pesquisador Produtividade do Instituto UniCesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação (ICETI). isabele.emanuelli@unicesumar.edu.br

RESUMO

O aprimoramento da técnica de micromanipulação demanda um longo período de treinamento com material biológico, o que torna necessária a prática em modelos animais. Uma alternativa é a utilização de ovários de abatedouro de suínos e bovinos, contudo a opacidade do ooplasma pode dificultar o treinamento. O objetivo deste estudo foi validar um método alternativo em oócitos bovinos para treinamento de injeção intracitoplasmática de espermatozoide e avaliação de desempenho de profissionais de reprodução humana assistida. Foram puncionados 233 ovários de abatedouro, obtendo um total de 1163 oócitos. Os oócitos foram maturados por 24h e divididos nos 2 grupos: GC - grupo controle (não centrifugado); GCLAR - grupo ooplasma clarificado (15min/9000rpm) para realização dos experimentos: (1) avaliação morfológica da translocação lipídica; (2) avaliação da viabilidade técnica do modelo de treinamento pela análise do procedimento de ICSI por um profissional de reprodução assistida; (3) análise comparativa da eficiência do modelo de treinamento. A técnica disponibilizou uma área de trabalho clarificada (75 a 85% do ooplasma) em 89,6% dos oócitos. A visualização da entrada do espermatozoide no momento da ICSI só foi possível observar no GCLAR (76,92%). A análise dos parâmetros morfológicos, técnicos, bioéticos e econômicos do modelo proposto comparado ao humano e demais espécies revelou-se eficiente. O modelo desenvolvido foi satisfatório para translocar periféricamente os lipídeos citoplasmáticos tornando o ooplasma majoritariamente translúcido e eficiente para o treinamento, e otimizou a acuidade visual do ooplasma.

PALAVRAS-CHAVE: icsi; micro manipulação; modelo animal; translocação lipídica.

1 INTRODUÇÃO

A injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) constituiu um avanço no tratamento da infertilidade masculina, sendo uma das ferramentas fundamentais para correção de alterações relacionadas ao espermatozoide (PALERMO et al., 1992). Inicialmente, a aplicação clínica da ICSI era somente para pacientes com fator masculino alterado. Porém, atualmente é o tratamento de escolha para os casos em que houve falha na FIV convencional, tornando-se uma técnica essencial nos tratamentos de reprodução humana assistida (YAZAWA et al., 2007; GARCÍA-ROSELLÓ et al., 2009; VLOEBERGHES et al., 2013; HIRAOKA, 2015).

Em animais, as áreas mais usuais de aplicação da ICSI são na conservação da biodiversidade, produção transgênica, solucionar problemas no sistema de fertilização *in vitro* como na espécie equina (GARCÍA - ROSELLÓ et al., 2009) e, principalmente, o uso em experimentação e em treinamento de novos profissionais (SANTOS et al., 2014; LANGBEEN et al., 2015).

Assim como outros procedimentos laboratoriais, a ICSI é dependente do operador e requer treinamento para ser executado com sucesso. Atualmente, laboratórios de reprodução assistida proporcionam treinamentos internos de capacitação para embriologistas juniores, a fim de aprimorar a técnica de ICSI (DURBAN, et al. 2016).

Entretanto, na literatura científica, poucos protocolos de treinamento para ICSI foram relatados (GVAKHARIA et al., 2000; RODRIGUES 2006; DURBAN, et al. 2016).

Por ser complexa, a ICSI requer um longo período de treinamento com material biológico (MENDES; SILVEIRA; STETLER et al., 1998). Um estudo que avaliou o aprendizado da técnica de novos profissionais revelou que em 40 horas de treinamento nenhum aluno foi capaz de executar uma única injeção de espermatozoide, necessitando para tanto um grande número de oócitos (RODRIGUES, et al. 2006).

Alguns estudos apontam que o treinamento da ICSI pode ser realizado utilizando oócitos humanos degenerados, ou então utilizando oócitos humanos com injeção de microesferas de látex para substituir o espermatozoide (KAORUKO, et al., 2002; DURBAN, et al. 2016), sobretudo o volume de gametas disponíveis não supre a demanda de um treinamento eficiente.

Para suprir a demanda de treinamento profissional desta biotécnica, tornam-se necessários treinamentos em modelos animais. O camundongo, modelo de eleição para treinamento de diversas técnicas, não possui boa aplicabilidade para treinamentos de ICSI, devido a diferença de aspectos morfológico dos gametas (SANTOS et al., 2014), embora existam estudos para treinamento ou experimentação de ICSI utilizando oócitos de camundongo com espermatozoides humanos (KAROUKO, et al., 2002). Os oócitos de hamster também são utilizados para o treinamento de ICSI (GVAKHARIA et al., 2000). No entanto, ambos os modelos de oócitos (camundongo e hamster) possuem a desvantagem de terem um diâmetro muito inferior aos oócitos humanos (GRIFFIN et al., 2006).

Uma alternativa ao uso de gametas humanos e de cobaias animais é usar nos modelos de treinamento com oócitos de animais de produção, retirados dos resíduos de ovários de abatedouro. Os modelos suíno e bovino são utilizados com maior frequência para esta finalidade (RODRIGUES et al., 2006; ALMODIN, et al., 2008), tendo como vantagem a facilidade de obtenção e a semelhança de tamanho com o gameta feminino humano. Apesar disso, nestas espécies, os oócitos apresentam um grande acúmulo lipídico no citoplasma o que o torna escurecido quando comparado ao ooplasma humano (DALBIES-TRAN et al., 2020).

A grande opacidade do ooplasma nos oócitos bovinos, pelo excesso lipídico, pode resultar em dois problemas no treinamento da ICSI: a incerteza da injeção do espermatozoide no citoplasma, bem como a quantidade de líquido introduzida no momento da injeção (BORINI et al., 2005). Uma alternativa para solucionar este problema poderia ser a clarificação do citoplasma através do método de centrifugação. A centrifugação clarifica o ooplasma por polarização, lipídica que é o componente responsável por escurecer as organelas celulares no oócito (RHO et al., 1997).

Em suma, os pontos primordiais que facilitam a utilização de oócitos bovinos é a similaridade morfofuncional dos gametas (SANTOS et al., 2014), o grande volume de material disponível em resíduos de abatedouro e principalmente não necessitar o manuseio de animais vivos para obtenção. Entretanto, este modelo possui a desvantagem da coloração do ooplasma, pois não permite uma clareza visual no momento de injeção do espermatozoide (CHUNG; KEEFER; DOWNEY, 2000; DALBIES-TRAN et al., 2020). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi validar um método alternativo em oócitos bovinos para treinamento de ICSI e para avaliação de desempenho de novos profissionais de reprodução humana assistida.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Ovários bovinos (*Bos taurus*) foram obtidos em abatedouros e transportados para o laboratório em solução salina para aspiração manual dos folículos e coleta dos complexos cúmulos oócitos. Nenhum animal vivo foi manuseado para execução dos experimentos. O estudo foi conduzido em delineamento casualizado, composto por um grupo controle e um grupo tratamento. As produções *in vitro* foram realizadas na Fazenda Escola – BIOTEC, da Universidade Cesumar / UNICESUMAR, Maringá, estado do Paraná (23°25'S, 51°57'W e altitude de 550 metros), entre os meses de setembro a dezembro de 2020. Os produtos químicos e meios foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) e Gibco (Langley, OK, USA).

Os oócitos bovinos maturados foram divididos nos 2 grupos: GC - grupo controle (não centrifugado); GCLAR - grupo ooplasma clarificado (15min/9000rpm). Para tanto, três experimentos foram conduzidos: (1) Avaliação morfológica da translocação lipídica; (2) Avaliação da viabilidade técnica do modelo de treinamento de ICSI; (3) Análise comparativa da eficiência do modelo bovino de treinamento. (Figura 1).

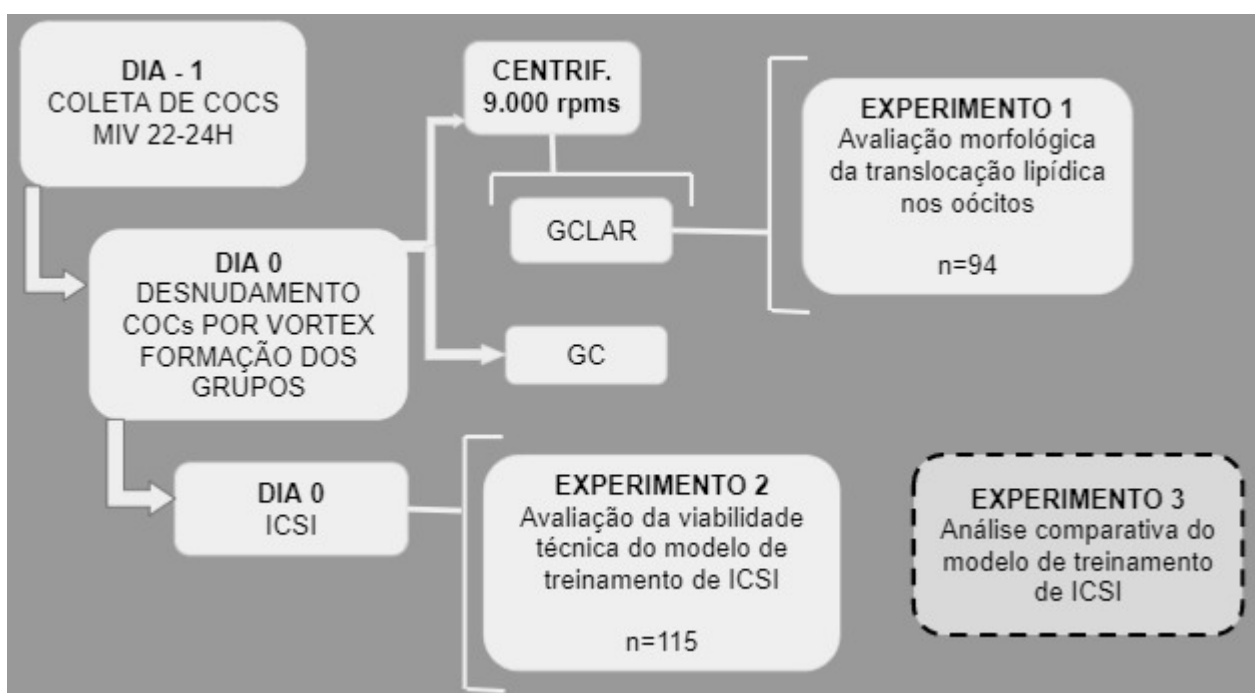


Figura 1: Experimento 1- Avaliou a morfologia dos oócitos quanto à translocação lipídica após os tratamentos de centrifugação; Experimento 2- Avaliou a viabilidade técnica do modelo de treinamento de ICSI; Experimento 4 - Realizou-se uma análise comparativa da eficiência do modelo de treinamento de ICSI.

2.2 MATURAÇÃO *in vitro*

Foram puncionados 233 ovários, obtendo um total de 1163 complexos *cumulus* oócitos (COCs). Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas provenientes de descarte de abatedouro e transportados para o laboratório em garrafa térmica em solução salina (NaCl a 0,9%) 34-36°C, os ovários foram aspergidos com álcool 70° e lavados em solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS). Os folículos ovarianos de 2-8 mm de diâmetro foram puncionados usando agulhas calibre 18G acopladas a seringas de 10mL e o líquido folicular recuperado foi depositado em tubos de 50mL. Após 20 minutos, o sedimento foi avaliado para a seleção dos COCs que apresentavam ooplasma homogêneo e *cumulus* compacto com mais de uma camada de células. Os COCs selecionados foram lavados em TCM199 suplementado com Hepes e colocados em placas com meio de maturação TCM199 com sais de Earles (Gibco®), glutamina (Sigma® cod: G8540) e NaHCO₃

(Mallinckrodt®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®), 22µg/mL piruvato (Biochemical® cod: 44094), 50µg/mL de gentamicina (Sigma® cod: G1272), 0,5µg de FSH/mL (Bioniche®), 50µg de LH/mL (Bioniche®) e 1µg de estradiol/mL (Sigma® cod: E2758), mantidos em estufa, a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar e com máxima umidade durante 22-24 horas.

2.3 INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES

Os oócitos dos dois grupos (GC = 50 e GCLAR = 65) foram desnudados no vórtex por 5 minutos e após lavados com meio de bancada (TCM 199 com sais de *Hank's* e 25mM de tampão Hepes suplementado com 10% de soro fetal bovino) e mantidos neste mesmo meio em gotas 500µl cobertas com óleo mineral. Os oócitos que apresentaram o primeiro corpúsculo polar foram separados em outra gota de 500µl de meio de bancada. Os oócitos do grupo tratamento (GCLAR) foram centrifugados em eppendorf de 1,5ml com 400µl de meio TCM Hepes acrescido de BSA (0,006mg/ml) em micro centrífuga a 9000 RPM por 15 minutos. Os palhetes de sêmen foram descongelados à 35° C por 30 segundos, depositados sobre o gradiente de Percoll 45-90% e centrifugados por 9 minutos a 1200 Rpm. O sobrenadante foi retirado e acrescentado 2 ml de meio FIV acrescido de heparina (200 µg/ml) para lavagem dos espermatozoides e centrifugados por 2 minutos a 1200 Rpm. Após foram ressuspensos com 30µl de meio FIV acrescido de heparina (200 µg/ml) e incubados por 15 minutos em uma incubadora de CO₂. A placa de ICSI utilizada foi uma placa de Petri contendo gotas em que os oócitos que apresentaram o primeiro corpúsculo polar dos GC e GCLAR foram depositados. A gota de espermatozoide foi composta de 1µl da suspensão de sêmen capacitado e 20µl de PVP 10%. Após 30 minutos do processo de ICSI, os oócitos de ambos os grupos foram ativados em Cálcio Ionóforo por 5 minutos. Logo após, foram lavados em TCM Hepes acrescido de BSA FV (0,006 mg/ml) e incubados por três minutos. Em seguida, foram lavados em meio SOF e colocados em placas de cultivo sem monocamada de células a uma atmosfera controlada de 5% O₂. Decorrido 48 horas dos tratamentos foi avaliado a taxa de clivagem dos 2 grupos.

A microinjeção de espermatozoides por ICSI foi realizada conforme descrito em estudos anteriores (KATAYOSE et al., 1999; HORIUCHI et al., 2002; EMUTA e HORIUCHI, 2001) por um profissional experiente e capacitado para o procedimento. A micromanipulação foi realizada usando um microscópio invertido equipado acoplado a um micro manipulador (Narishige Instrument, Tóquio, Japão). Foram utilizadas duas pipetas de vidro: uma pipeta de fixação (holding com 10 a 20 µm de diâmetro) e uma pipeta de injeção (*inject*) com diâmetro interno de 7 a 8 µm. Imediatamente antes da injeção, um espermatozoide móvel foi imobilizado quebrando a cauda, com a ponta da pipeta de injeção. A zona pelúcida foi perfurada pela pipeta *inject*, em seguida, o espermatozoide foi empurrado para frente até sua cabeça se aproximar da ponta da pipeta. A pipeta se projetou no ooplasma até sua ponta atingir o centro do oócito. Após a microinjeção, os oócitos foram transferidos para uma gota de 50 µl de TCM199 suplementado com 5% de SFB em óleo mineral e mantido a 38,5°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ no ar até a finalização de todos os procedimentos de ICSI. No grupo tratamento, a injeção foi realizada no polo clarificado, oposto a deposição lipídica.

2.3.1 Experimento 1: Avaliação morfológica da translocação lipídica

A avaliação morfológica da translocação lipídica foi realizada por análise em microscopia óptica invertida associada à captura de imagem e mensuração no programa IMAGE-PRO® PLUS. Após a maturação *in vitro*, os COCs foram desnudados com auxílio

do vórtex em meio HEPES para retirada das células do *cumulus*. Posteriormente os oócitos foram divididos nos dois grupos experimentais, grupo controle sem centrifugação (GC = 48) e o grupo centrifugado 15 minutos (GCLAR = 48). Foram feitas observações para mensuração da área clarificada e do percentual de deslocamento dos lipídeos citoplasmáticos (coloração castanho-escuro), por meio da força de centrifugação. Após a centrifugação, os oócitos foram classificados conforme o percentual de clarificação do ooplasma: GRAU I: 0%; GRAU II: 75% GRAU III: 85%.

2.3.2 Experimento 2: Avaliação da viabilidade técnica do modelo de treinamento de ICSI

Para a viabilidade técnica realizou-se estudo prospectivo da análise do procedimento de ICSI por um profissional embriologista do sexo feminino. Para a avaliação da viabilidade técnica do método de treinamento desenvolvido foram utilizados 115 oócitos maturados por 24 horas e desnudos conforme já descrito. Para tanto, foi realizada a análise dos seguintes parâmetros: visualização do corpúsculo polar; visualização da coluna de líquido; visualização do espermatozoide no momento da técnica de ICSI conforme demonstrado na Figura 2.

No momento do estudo, a embriologista era previamente proficiente em processamento de sêmen, manuseio de oócitos, e com experiência em micromanipulação há 20 anos. Esta escolha foi tomada para avaliar apenas os parâmetros observados no momento da ICSI, retirando a variável da habilidade técnica do profissional.

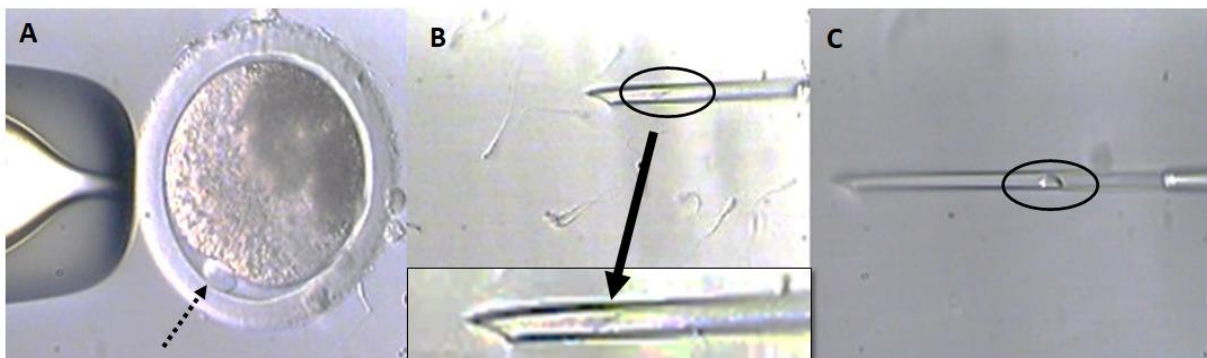


Figura 2: Avaliação da viabilidade técnica do método de treinamento realizada pela avaliação dos seguintes parâmetros: A - Visualização do corpúsculo polar (seta preta) em oócito bovino do grupo tratamento onde houve a translocação do lipídio polarmente formando uma espécie de calota em um dos polos possibilitando uma área translúcida para realizar treinamentos de injeção intracitoplasmática. B - Visualização do espermatozoide no interior da pipeta *inject* (seta preta) no momento da aplicação da técnica. C - Visualização da coluna de líquido.

2.3.3 Experimento 3: Análise comparativa da eficiência do modelo

Esta análise avaliou os aspectos bioéticos, econômicos, técnicos e morfofuncionais do modelo proposto comparando-os com os modelos de treinamentos descritos na literatura: suíno; camundongo; bovino e humano. Os parâmetros de comparação utilizados entre os modelos foram: morfologia do oócito, densidade lipídica do oócito; coloração do ooplasma; tamanho médio oócito, origem do material, disponibilidade de obtenção de oócitos, custo, necessidade de biotério, forma da maturação dos oócitos (*in vitro* ou *in vivo*), semelhança com o espermatozoide humano e aspectos éticos e bioéticos. Para os parâmetros morfológicos utilizou-se o modelo humano como o padrão ouro a ser atingido. Outra variável avaliada no modelo proposto foi a disponibilidade de ovários de abatedouro e a recuperação de oócitos.

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram realizadas utilizando o software SAS, versão 9.1. No experimento 1 aplicou-se uma análise estatística descritivas nos dados obtidos. O teste Qui-quadrado foi utilizado no experimento 2 para a análise dos seguintes parâmetros: visualização do corpúsculo polar; visualização da coluna de líquido; visualização do espermatozoide no momento da técnica de ICSI.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas as análises sobre os efeitos da centrifugação sobre a distribuição lipídica visando estabelecer uma técnica de translocação lipídica do citoplasma para o uso de oócitos bovinos de abatedouro em treinamentos de ICSI humana. O modelo proposto transloca o lipídio polarmente formando uma espécie de calota em um dos polos possibilitando uma área translúcida para realizar treinamentos de injeção intracitoplasmática.

Os resultados obtidos indicaram a alteração morfológica quanto a distribuição lipídica após a centrifugação (Experimento 1; Figura 3). O grupo controle manteve a distribuição lipídica em 100% (48/48) dos oócitos analisados, permanecendo com a coloração escura homogênea por toda extensão do ooplasma, o que caracteriza a classificação de grau I do percentual de clarificação do ooplasma (Figura 3A). Já no modelo de clarificação proposto, os lipídeos deslocaram-se resultando em um percentual de clarificação do ooplasma no grau II de 47,9% (23/48; Figura 3B) e no grau III em 41,7% (20/48; Figura 3C) dos oócitos analisados. Estes resultados revelam que a técnica disponibiliza uma área de trabalho clarificada para realização da ICSI em 89,6% (43/48) das vezes.

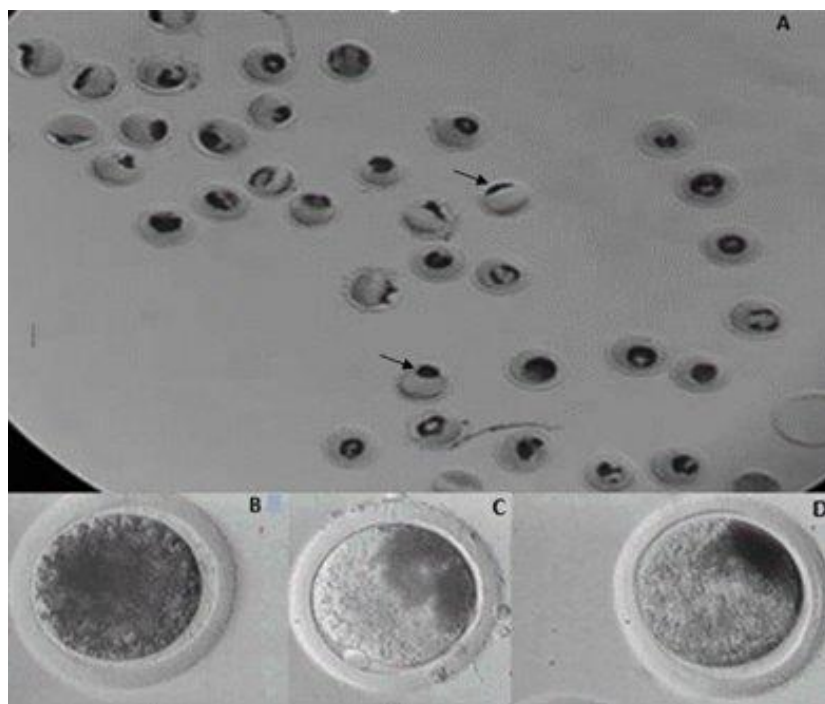


Figura 3: A - Oócitos bovinos maduros submetidos por 15 minutos de centrifugação de 9.000 RPM evidenciando o estrato lipídico polar no ooplasma (seta preta). A figura indica os diferentes padrões de deslocamento lipídico (Estereomicroscópio). B, C e D - imagens representativas da análise morfológica da translocação lipídica dos oócitos bovinos desnudos em microscopia óptica associada a captura de imagem e mensuração no programa IMAGEPRO® PLUS. Após as 24h de

maturação *in vitro* os oócitos passaram pelo tratamento de centrifugação e foram classificados nos padrões morfológicos quanto o percentual de clarificação do ooplasma: B - GRAU I: 0%; C - GRAU II: 75%; D - GRAU III: 85%.

No experimento 2, em que se avaliou a viabilidade da técnica de ICSI (Tabela 1), não houve diferença no parâmetro de visualização do corpúsculo polar entre o grupo tratado e o controle, respectivamente 80% (52/65) e 72% (36/50). A visualização da entrada do espermatozoide, no momento da ICSI, só foi possível observar no GCLAR (76,92%), sendo que em nenhuma das tentativas de ICSI do GC foi possível a visualização do espermatozoide, devido a opacidade e coloração do ooplasma. Já na visualização da coluna de líquido, foi possível observar na totalidade das ICSI do GCLAR e apenas em 5,56% dos procedimentos. Mesmo que em muitas vezes não tenha sido possível observar alguns dos parâmetros, o embriologista conseguiu realizar o procedimento de ICSI em 100% das tentativas nos dois grupos.

Em um estudo científico que testou a habilidade em cinco trainees, utilizando oócitos humanos e microesferas de látex nas injeções, apresentou dados extremamente inferiores. O sucesso no procedimento de ICSI foi alcançado após 55 tentativas em média (DURBAN et al., 2016). Com isso, pode-se afirmar que o resultado do sucesso do presente modelo foi devido à grande experiência do embriologista. Outro estudo que avaliou um modelo de treinamento de ICSI, utilizando oócitos de hamster com espermatozoide humano, descreve que as taxas de dano ao oócito podem ser altas quanto 20% a 30% e que estes danos diminuem com o treinamento desenvolvido através do trabalho. O protocolo de treinamento realizado no estudo exigia a injeção de pelo menos 150 oócitos (10-15 óvulos por sessão) para capacitar um novo profissional (GVAKHARIA et al., 2000).

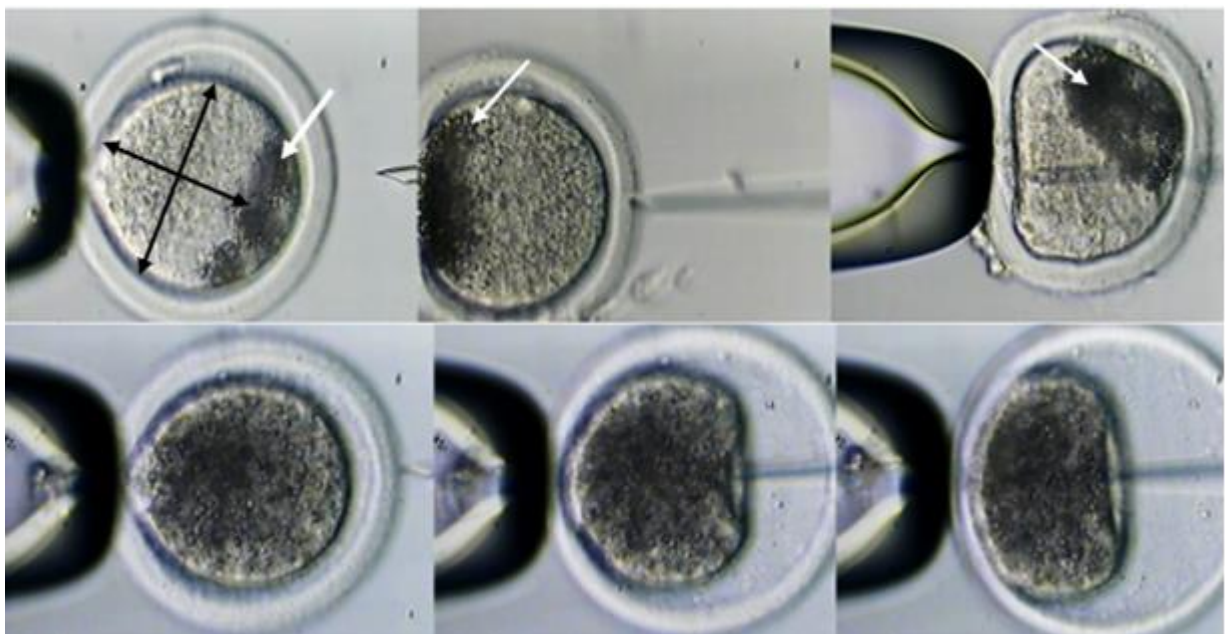


Figura 4: Imagens ilustrativas das validações do procedimento de ICSI: A, B e C oócitos do grupo tratamento (GCLAR). Área clarificada do ooplasma (seta preta) e deposição polar dos lipídeos formando um estrato escuro (seta branca). A: oócito bovino clarificado fixado horizontalmente na pipeta *holding* por meio de leve sucção posicionado para o início da ICSI; B: oócito bovino clarificado fixado horizontalmente na pipeta *holding* por meio de leve sucção e inserção de pipeta *inject* contendo um único espermatozoide localizada com a ponta direcionada para a posição de 3 horas; C: visualização da inserção da pipeta *inject* e aspiração do citoplasma do oócito clarificado para posterior deposição do espermatozoide no ooplasma. D, E e F oócitos do grupo controle (GC). D: oócito bovino sem tratamento fixado horizontalmente na pipeta *holding* por meio de leve sucção posicionado para o início da ICSI; E: oócito bovino fixado horizontalmente na pipeta

holding por meio de leve sucção e inserção de pipeta *inject* contendo um único espermatozoide localizada com a ponta direcionada para a posição de 3 horas; F: inserção da pipeta *inject* e aspiração do citoplasma do oócito do grupo controle sem visibilidade da execução da técnica para posterior deposição do espermatozoide no ooplasma.

Tabela 1: Avaliação da viabilidade técnica durante a realização da técnica de ICSI dos parâmetros: visualização do corpúsculo polar, visualização da coluna de líquido, visualização da entrada do espermatozoide. Dados relativos ao experimento 3: avaliação da viabilidade técnica do modelo de treinamento.

PARÂMETROS AVALIADOS NA ICSI					
Grupo	Centrifugação	Oócitos totais (n)	Visualização do corpúsculo polar % (n)	Visualização da coluna de líquido % (n)	Visualização da entrada do espermatozoide % (n)
GC	-	50	72,00 (36/50)	5,56 (2/36) ^a	0 (0/36) ^a
GCLAR	15 min	65	80,00 (52/65)	100,00 (52/52) ^b	76,92 (40/52) ^b

^{a,b} Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (valor $p \leq 0,05$) entre os grupos da mesma coluna.

No frigorífico utilizado no presente estudo, eram abatidas em média 50 fêmeas bovinas diariamente resultando em 100 ovários, e consequentemente em torno de 700-500 oócitos, considerando 7-5 oócitos/ovário. Para obter uma quantidade similar de oócitos em camundongo, seria requerido aproximadamente 66 animais (considerando 15 oócitos/fêmea) e necessitaria realizar o procedimento de eutanásia para a recuperação dos oócitos por remoção do oviduto e dissecação da massa dos complexos cumulus oócitos das ampolas (NAGY et al. 2003; DJUWITA et al., 2011; ÁGUILA et al., 2017).

Analisando as principais semelhanças entre o modelo bovino clarificado e os dados dispostos na literatura dos modelos suíno, camundongo e bovino, quando comparados ao humano obteve-se dados satisfatório para o modelo proposto. Por exemplo, o diâmetro do oócito é semelhante entre humanos, suínos e bovinos, mas é menor em camundongos (OTOI, 1997; KHALILI et al. 2013; GRIFIN et al. 2006). A densidade lipídica e consequentemente a coloração do ooplasma do modelo clarificado alcançou semelhança ao oócito de camundongo e de humanos (DALBIES-TRAN, 2020; MCEVOY, 2000; SANTOS, 2014). O gameta masculino é semelhante ao humano na maioria das espécies, exceto em camundongos em que apresenta morfologia da cabeça completamente distinta (SANTOS, 2014).

A disponibilidade de obtenção de oócitos é alta em todas as espécies animais (SANTOS, 2014), exceto em humano, em que se utiliza apenas oócitos degenerados, ou oócitos íntegros, porém, neste caso, o treinamento não utiliza espermatozoide humano (GVAKHARIA, et al., 2000; DURBAN et al., 2016). Um estudo que avaliou o aprendizado da técnica de novos profissionais revelou que, após 60 horas, foram capazes de injetar 1,5 oócitos e, ao final das 80 horas, 4 oócitos foram injetados por hora (RODRIGUES et al., 2006). Esses dados refletem a importância de se ter um grande número de oócitos para rotinas de treinamentos de novos profissionais.

Na análise comparativa, observou-se que, pelo fato de os ovários de abatedouro serem um resíduo de descarte dentro da cadeia produtiva da carne, não há custo; o único custo seria com o transporte do material (ALMODIN et al., 1993; GIBBONS et al., 2008).

Em contrapartida, o uso de cobaias para tais fins requer um biotério próprio ou a compra de animais proveniente de terceiros, com custos variando de U\$ 4,50/animal (ALMODIN et al., 1993; USP, 2015). Desta forma, o presente modelo bovino possui baixo custo, ao contrário dos modelos que utilizam camundongo como cobaias, por constituírem uma fonte barata e abundante de oócitos como já descrito na literatura (GIBBONS et al., 2008).

Outro aspecto importante é que o presente modelo não envolve a manipulação de animais vivos, uma vez que utiliza material biológico de descarte. Sendo assim, não é necessária a aprovação pelo CEUA, órgão fiscalizador do uso de animais vivos em pesquisa científica, em treinamento e aulas práticas (MACHADO et. al, 2010; ARCK, 2019). Desta forma, o modelo proposto adere temática do bem-estar animal e fomenta o uso ético dos animais, retomando o princípio dos 3R's desenvolvido por Russell e Burch: refinamento, redução e substituição (RUSSEL e BURCH, 1959; ARCK, 2019).

Resumidamente, a análise global dos parâmetros morfológicos, técnicos, bioéticos e econômicos do modelo proposto comparado ao humano e demais espécies revelou-se eficiente e semelhante ao modelo humano, possibilitando programas de treinamento para alcançar proficiência técnica em micromanipulação sem uma fase inicial de baixas taxas de sucesso. Assim, este estudo estabeleceu uma metodologia de um sistema de treinamento padronizado, usando um modelo animal alternativo (sem animais vivos) contribuindo para evitar problemas éticos associadas ao uso de oócitos humanos por técnicos não qualificados (GVAKHARIA, et al., 2000).

4 CONCLUSÃO

O modelo desenvolvido com o método de clarificação foi satisfatório para translocar periféricamente os lipídeos citoplasmáticos, tornando o ooplasma majoritariamente translúcido e eficiente para o treinamento da ICSI. O modelo otimizou a acuidade visual do ooplasma no momento da ICSI. Com isso, a técnica pode permitir a comparação direta da proficiência técnica da ICSI entre laboratórios, fornecendo um método alternativo para treinar técnicos na execução de micro injeção e para avaliar sua competência técnica.

REFERÊNCIAS

ÁGUILA, L., FELMER, R., ARIAS, M. E., NAVARRETE, F., MARTIN-HIDALGO, D., LEE, H. C., ... & FISSORE, R. Defective sperm head decondensation undermines the success of ICSI in the bovine. **Reproduction**, v. 154, n. 3, p. 307-318, 2017.

AGOSTINHO, B. F.; SERRILHO, T. V. P.; EMANUELLI, I. P.; CAVALIERI, F. L. B.; SEKO, M. Clarificação de citoplasma em oócitos visando viabilizar a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) em bovinos. **Anais. IV Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar**. Maringá: UNICESUMAR, 2008.

ALMODIN, CARLOS GILBERTO; MINGUETTI, VANIA CIBELE; STORLI, SÉRGIO. Controle de qualidade e treinamento técnico com embriões bovinos para laboratórios de FIV. **Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia**, p. 293-7, 1993.

ALMODIN, C. G., MINGUETTI-CÂMARA, V. C., OLIVEIRA, L. M., & SEKO, M. B. Vitrificação em modelos bovinos: modelo de treinamento. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, v.12, p.20-23, 2008.

ARCK, Petra Clara. When 3 Rs meet a forth R: Replacement, reduction and refinement of animals in research on reproduction. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 132, p. 54-59, 2019.

BORINI, A., LAGALLA, C., CATTOLI, M., SERENI, E., SCIAJNO, R., FLAMIGNI, C., & COTICCHIO, G. Predictive factors for embryo implantation potential. **Reproductive biomedicine online**, v. 10, n. 5, p. 653-668, 2005.

BRASIL. República Federativa do Brasil. **Lei nº 11.794**, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. **Normativas do Concea para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. 3ª ed. Brasília: Concea; 2016.

DALBIES-TRAN, R., CADORET, V., DESMARCHAIS, A., ELIS, S., MAILLARD, V., MONGET, P., MONNIAUX, D., REYNAUD, K., SAINT-DIZIER, M., UZBEKOVA, S. A comparative analysis of oocyte development in mammals. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 1002, 2020.

DIEZ, C., LE BOURHIS, D., HEYMAN, Y., & RENARD, J. P. Effect of partial lipid removal from in vitro produced bovine zygotes on further development in vitro and on the freezing tolerance of blastocysts. **Theriogenology**, v. 1, n. 45, p. 166, 1996.

DJUWITA, I., MOHAMAD, K., & SUPRIATNA, I. Number and Quality of Oocytes Collected from Heterotopic Autografted Mice Ovary after PMSG Induction. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 18, n. 4, p. 151-156, 2011.

DURBAN, M., GARCÍA, D., OBRADORS, A., VERNAEVE, V., & VASSENA, R. Are we ready to inject? Individualized LC-CUSUM training in ICSI. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 33, n. 8, p. 1009-1015, 2016.

GARCÍA-ROSELLÓ, E.; GARCÍA-MENGUAL, E.; COY, P., ALFONSO, J. and SILVESTRE, M. Intracytoplasmic Sperm Injection in Livestock Species: An Update. **Reproduction in Domestic Animals**, 44: 143-151, 2009.

GIBBONS A, BONNET FP, CUETO MI, CATALA M, SALAMONE DF, GONZALEZ -Bulnes A. Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. **Reprod Domest Anim**, v.42, p.423-426, 2007.

GRIFFIN, J., EMERY, B. R., HUANG, I., PETERSON, C. M., & CARRELL, D. T. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). **Journal of experimental & clinical assisted reproduction**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2006.

GVAKHARIA, MARINA O.; LIPSHULTZ, LARRY I.; LAMB, DOLORES J. Human sperm microinjection into hamster oocytes: a new tool for training and evaluation of the technical proficiency of intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and sterility**, v. 73, n. 2, p. 395-401, 2000.

HIRAOKA K, KITAMURA S. Eficiência clínica de Piezo-ICSI usando micropipetas com uma espessura de parede de 0,625 μm . **J Assist Reprod Genet.** 2015; 32: 1827–33. DOI: 10.1007 / s10815-015-0597-9.

KAORUKO MIZUNO, KAZUHIKO HOSHI, THOMAS HUANG, Fertilization and embryo development in a mouse ICSI model using human and mouse sperm after immobilization in polyvinylpyrrolidone, **Human Reproduction**, Volume 17, Issue 9, September 2002, Pages 2350–2355

KEEFER C.L. Fertilization by sperm injection in the rabbit. **Gamete Res.** 1989; 22: 59-69

KIMURA Y, YANAGIMACHI R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. **Biol Reprod.** V.52(4):709-720, 1995. doi:10.1095/biolreprod52.4.709

KHALILI, M. A., NOTTOLA, S. A., SHAHEDI, A., & MACCHIARELLI, G Contribution of human oocyte architecture to success of in vitro maturation technology. **Iranian journal of reproductive medicine**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.

LANGBEEN, N.; HANNELORE, F.M.D.P.; BARTHOLOMEUS, E.; JO L.M.R.; LEROY, P. E.J. Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. **Theriogenology**, v.84, n. 4, p. 477-489, 2015.

MACHADO, C. J. S., FILIPECKI, A. T. P., TEIXEIRA, M. D. O., & KLEIN, H. E. A regulação do uso de animais no Brasil do século XX e o processo de formação do atual regime aplicado à pesquisa biomédica. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 17, n. 1, p. 87-105, 2010.

MCEVOY, T. G., COULL, G. D., BROADBENT, P. J., HUTCHINSON, J. S., & SPEAKE, B. K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of reproduction and fertility**, v. 118, n. 1, p. 163-170, 2000.

OTOI, T., YAMAMOTO, K., KOYAMA, N., TACHIKAWA, S., & SUZUKI, T. BOVINE OOCYTE DIAMETER IN RELATION TO DEVELOPMENTAL COMPETENCE. **THERIOGENOLOGY**, V. 48, N. 5, P. 769-774, 1997.

PALERMO G, JORIS H, DEVROEY P, VANSTEIRTEGHEM AC. Pregnancies after Intracytoplasmic Injection of Single Spermatozoon into an Oocyte. **Lancet.** v. 340, n. 8810, p. 17-18, 1992.

RESTREPO BETANCUR, Giovanni; RESTREPO ESCOBAR, Sara. Consideraciones importantes acerca de la producción in vitro de embriones equinos. **Ces. Med. Vet. Zootec.**, Medellín, v. 6, n.1 p. 55-63, Jan. 2011

RUSSELL, WILLIAM MOY STRATTON; BURCH, REX LEONARD. **The principles of humane experimental technique.** Methuen, 1959.

SANTOS, REGIANE R.; SCHOEVERS, ERIC J.; ROELEN, BERNARD AJ. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2014.

SERVIÇO DE BIOTÉRIO (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO) **PREFEITURA DO CAMPUS USP DE RIBEIRÃO PRETO**. Disponível em:
<https://sites.usp.br/bioteriogereral/animais/valor/>. Acesso em 07. jan. 2021.

VLOEBERGHES, VEERLE; VERHEYEN, GRETA AND TOURNAYE, HERMAN.
Intracytoplasmic spermatid injection and in vitro maturation: fact or fiction?. **Clinics**, vol.68, suppl. pp.151-156, 2013.

YAZAWA H, YANAGIDA K, SATO A. Human round spermatids from azoospermic men exhibit oocyte-activation and Ca²⁺ oscillation-inducing activities. **Zygote**. v. 15, n. 4, p. 337-346, 2007.