

**FLÁVIO GUISELLI LOPES**

**DIFERENTES SOLUÇÕES DE MANIPULAÇÃO NA VIABILIDADE DE  
EMBRIÕES DE CAMUNDONGAS E NA TAXA DE GESTAÇÃO DE  
RECEPTORAS DE EMBRIÃO BOVINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L864d  
2009

Lopes, Flávio Guiselli, 1978-

Diferentes soluções de manipulação na viabilidade de embriões de camundongas e na taxa de gestação de receptoras de embrião bovino. – Viçosa, MG, 2009. xi, 121f. : il ; 29cm.

Orientador: Eduardo Paulino da Costa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Bovino - Reprodução. 2. Reprodução animal.  
3. Transferência de embriões. 4. Embriologia - Cultura e meios de cultura. 5. Biologia do desenvolvimento.  
6. Camundongo. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22.ed. 636.089

FLÁVIO GUISELLI LOPES

DIFERENTES SOLUÇÕES DE MANIPULAÇÃO NA VIABILIDADE DE  
EMBRIÕES DE CAMUNDONGAS E NA TAXA DE GESTAÇÃO DE  
RECEPTORAS DE EMBRIÃO BOVINO

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária,  
para obtenção do título de *Doctor  
Scientiae*.

APROVADA: 30 de maio de 2009.



Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula  
(Co-orientador)



Prof. Laércio dos Anjos Benjamin



Prof. Alan Maia Borges



Dr. Cláudio José Borela Espescht



Prof. Eduardo Paulino da Costa  
(Orientador)

*...“nada resiste ao trabalho, não existe muito esse negócio de talento, o que existe mesmo é dedicação, esforço e suor”...*

*Nuno Cobra*

A Deus por tornar tudo possível e iluminar meus caminhos.

Aos meus pais Anselmo Lopes Leoni e Vera Lúcia Guiselli Lopes pelas lições de vida, apoio incondicional e grande incentivo.

Ao meu irmão Rafael Guiselli Lopes pelo companheirismo e amizade.

Aos demais familiares.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Medicina Veterinária (DVT) pela oportunidade de realizar o curso de Pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Biotério Central – CCB/ UFV por disponibilizar os animais (camundongos) para a realização da etapa experimental de laboratório, em nome da professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

À Empresa Biotran® – Biotecnologia e Treinamento em Reprodução Animal por disponibilizar propriedades, animais, materiais e equipamentos para a realização da etapa experimental de campo, em nome do Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes.

À Labtec – Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia – UFV por disponibilizar o laboratório, materiais e equipamentos para a realização da quantificação de expressão gênica, em nome da professora Simone Eliza Facioni Guimarães e dos pós-graduandos Carlos Souza do Nascimento e Priscila Vendramini Silva.

Ao Bioagro – Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – UFV por disponibilizar o laboratório, materiais e equipamentos para a realização das análises de apoptose celular, em nome do professor Joaquim Hernán Patarroyo Salcedo, da professora Marlene Isabel Vargas Vilorio e do pós-graduando Gabriel Domingos Carvalho.

À Empresa Germovet® – Biotecnologia em Reprodução Animal por disponibilizar materiais e equipamentos para a realização deste trabalho, em nome de Aurea Helena Assis da Costa.

Ao meu grande amigo professor Eduardo Paulino da Costa pela orientação, convívio ao longo dos anos, confiança, exemplo de integridade, seriedade e dedicação ao trabalho, pessoa que tanto contribuiu para minha formação profissional e pessoal.

Ao Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes e ao professor Tarcízio Antônio Rêgo de Paula pela co-orientação, amizade, constante apoio e valiosa colaboração na estruturação e revisão deste trabalho.

Aos professores Abelardo Silva Júnior, Cláudio José Borela Espeschit, Laércio dos Anjos Benjamin pela amizade, sugestões e disponibilidade em participar da banca de exame de qualificação.

À Comissão Coordenadora de Pós-graduação – DVT/ UFV (Gestão 2006-2008), em nome dos professores Eduardo Paulino da Costa, Jackson Victor de Araújo, Joaquim Hernán Patarroyo Salcedo e Cláudio César Fonseca pela confiança e amizade.

Aos professores Alan Maia Borges, Cláudio José Borela Espeschit, e Laércio dos Anjos Benjamin pela amizade, sugestões e disponibilidade em participar da banca de tese.

À Rosinéia Aparecida da Cunha Andrade (Rosi), secretária da Pós-graduação – DVT/ UFV pela dedicação, enorme eficiência, amizade e confiança, sempre resolvendo nossos problemas com serenidade.

Ao Sr. Nenzinho (José Cândido), funcionário do Laboratório de Reprodução Animal – DVT/ UFV, pela amizade, exemplo de humildade, dedicação e simplicidade.

Aos amigos Emílio César Martins Pereira e Fabrício Albani Oliveira pelo apoio em todos os momentos, confiança, companheirismo e paciência.

Às bolsistas de Iniciação Científica Marianne Camargos Dias e Vanessa Lopes Dias Queiroz pelo apoio e amizade.

Aos colegas e ex-colegas do Setor de Cultivo Celular do Laboratório de Reprodução Animal – DVT/ UFV, Alessandra, Amanda, Camilla, Éder, Giancarlo, Giorgia, Gustavo, José Rogério, Paulo Alexandre, Rafael, Rodrigo e Sanely pela convivência e amizade.

Aos estagiários do Laboratório de Reprodução Animal – DVT/ UFV pela colaboração neste trabalho.

À Comissão de Ouvidoria – UFV (Gestão 2007-2008), em nome de Ângelo Antônio Ferreira, Gláucio Inácio da Silveira, George Henrique Kling de Moraes, Hugo Alberto Ruiz e José Arnaldo Redinz pela confiança e amizade.

Aos funcionários do Biotério Central – UFV, Adão e Juliano pela confiança, amizade e indispensável ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária – UFV, em especial aos amigos Adão, Cláudio, Claudiomiro, Dagoberto, Divino, Isabel (Bell), João, Luciano, Lucinda, Luis Márcio, Paulo, Tuim, Vantuil (Ratão), Valnei e Vavá pelo apoio e companheirismo.

Aos colegas e ex-colegas do Curso de Pós-graduação – UFV, Aline, André, Antônio Carlos, Carlos, Betânia, Bruno, Bruna, Cássio, Caroline, Charles, Elenice, Erick, Erotides, Evandro, Fábio, Gabriel, Grazielle, Jair, João Bosco, Juliana Borges, Juliana Milani, Kelly, Leonardo, Liana, Lincoln, Lucas, Luciana, Lukiya, Marcel, Márcio, Maria Helena, Marilú, Morgana, Napoleão, Paulo, Pedro, Rebeca, Rogério, Rose e Polyana pelo apoio e amizade.

Aos amigos de república Toca do Tatu, André Andrade, Gustavo Fialho, Henrique Volpe, Marcio Godinho, Olavo Romitelli, Otávio Henrique, Victor Rezende e agregados pelos bons momentos compartilhados.

Aos amigos das repúblicas e de Viçosa pelo companheirismo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!!

## **BIOGRAFIA**

FLÁVIO GUISELLI LOPES, filho de Anselmo Lopes Leoni e Vera Lúcia Guiselli Lopes, nasceu em Londrina, Paraná, no dia 17 de dezembro de 1978.

Em março de 1997, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Arapongas – PR, graduando-se em dezembro de 2001.

Em março de 2002, iniciou o curso de Mestrado em Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), concentrando seus estudos na área de Reprodução e Produção Animal, submetendo-se à defesa de dissertação no dia 29 de março de 2004.

Em março de 2005, iniciou o curso de Doutorado em Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), concentrando seus estudos na área de Reprodução e Produção Animal, submetendo-se à defesa de tese no dia 30 de maio de 2009.

## ÍNDICE

	Página
<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	5
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	8
2.1 Cultivo embrionário.....	8
2.1.1 Meios de manipulação.....	14
2.2 Desenvolvimento embrionário.....	15
2.2.1 Período pré-implantacional.....	17
2.3 Apoptose.....	19
2.3.1 Apoptose ou morte celular programada.....	19
2.3.2 Alterações morfológicas e bioquímicas.....	21
2.3.3 Vias de ativação da apoptose.....	22
2.3.3.1 Via extrínseca.....	22
2.3.3.2 Via intrínseca.....	23
2.3.4 Mecanismos de ativação da apoptose.....	25
2.3.4.1 Caspases.....	25
2.3.4.2 Proteínas da família Bcl-2.....	26
2.3.5 Ocorrência da apoptose.....	27
2.3.5.1 Estádio de clivagem e compactação.....	27
2.3.5.2 Blastocisto.....	27
2.3.6 Detecção de apoptose.....	28
2.4 Proteínas do choque térmico (Hsp).....	29
2.4.1 Família Hsp70.....	31
2.4.2 Expressão gênica.....	33
2.4.3 PCR quantitativo em tempo real.....	34
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	35
<b>CAPÍTULO 1 - Desenvolvimento de embriões de camundongas após manutenção em diferentes meios de manipulação</b> .....	49
Resumo.....	49
Abstract.....	50
Introdução.....	50
Material e Métodos.....	52
Resultados e Discussão.....	53
Conclusões.....	59
Referências bibliográficas.....	59
<b>CAPÍTULO 2 - Morfologia, apoptose celular e expressão gênica Hsp70.3 em embriões após manutenção em diferentes meios de manipulação e posterior cultivo <i>in vitro</i></b> .....	64

Resumo.....	64
Abstract.....	65
Introdução.....	66
Material e Métodos.....	67
Resultados e Discussão.....	74
Conclusões.....	79
Literatura Citada.....	80
<b>CAPÍTULO 3 - Número total de células e diâmetro de embriões mantidos previamente em diferentes meios de manipulação.....</b>	<b>83</b>
Resumo.....	83
Abstract.....	84
Introdução.....	85
Material e Métodos.....	86
Resultados e Discussão.....	90
Conclusões.....	96
Literatura Citada.....	96
<b>CAPÍTULO 4 - Diferentes meios de manipulação e sua influência na taxa de gestação de receptoras de embriões bovino.....</b>	<b>100</b>
Resumo.....	100
Abstract.....	101
Introdução.....	101
Material e Métodos.....	103
Resultados e Discussão.....	107
Conclusões.....	108
Literatura Citada.....	108
<b>CAPÍTULO 5 - Nova técnica para contagem do número de células de blastocistos.....</b>	<b>110</b>
Resumo.....	110
Abstract.....	111
Introdução.....	111
Material e Métodos.....	113
Resultados e Discussão.....	115
Conclusões.....	117
Referências Bibliográficas.....	117
<b>4. CONCLUSÃO FINAL.....</b>	<b>121</b>

## RESUMO

LOPES, Flávio Guiselli, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Maio de 2009.  
**Diferentes meios de manipulação na viabilidade de embriões de camundongas e na taxa de gestação de receptoras de embrião bovino.**  
Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Co-orientadores: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula, Luiz Sérgio de Almeida Camargo, João Henrique Moreira Viana e Carlos Antônio de Carvalho Fernandes.

O objetivo deste trabalho foi substituir as soluções de manipulação de embriões bovino em uso na rotina de TE por meios mais simples e estáveis e, que possam ser armazenados em temperatura ambiente. Na primeira etapa experimental, foram utilizados embriões de camundongas nos estádios de blastocisto inicial (Bin), mórula compacta grau I (Mcl) e II (McII), distribuídos aleatoriamente em três tratamentos, de acordo com o meio de manutenção: T1 - PBS modificado (Controle); T2 (MD1) e T3 (MD2). Os embriões foram mantidos durante quatro horas no meio de manutenção e, posteriormente cultivados em meio TCM 199. Após o término do tempo de cultivo, os embriões de cada tratamento foram separados aleatoriamente em amostras para avaliação da taxa de clivagem e morfometria, aspectos ultra-estruturais, detecção de apoptose celular e quantificação de expressão gênica de Hsp70.3. A taxa de desenvolvimento dos embriões após manutenção por quatro horas nos meios de manipulação foi inferior ( $P < 0,05$ ) para os embriões do Controle, quando comparada com os embriões do MD1 e MD2, diferença esta não observada ( $P > 0,05$ ) após o cultivo *in vitro*. Contudo, os embriões McII do MD2

tiveram um maior desenvolvimento ( $P < 0,05$ ), quando comparado com embriões do Controle e MD1, indicando o efeito benéfico do enriquecimento do meio MD2. Não foi verificada diferença ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos no diâmetro celular, nuclear, nucleolar, na relação núcleo:nucléolo, no número de células e na percentagem de células apoptóticas. Quanto à expressão gênica de Hsp70.3, foi verificada diferença entre tratamentos ( $P < 0,001$ ), em embriões Bin, Mcl e MclI após manutenção e, posterior cultivo *in vitro*. Na segunda etapa experimental, foram testados dois meios de manipulação utilizados para coleta e manipulação de embriões, MD1 e MD2 e como controle o PBS modificado, usualmente empregado nas rotinas de TE nas diferentes espécies animais. A transferência dos embriões bovino foi realizada a fresco, ou seja, os embriões coletados de uma determinada doadora foram inovulados no período máximo de quatro horas nas receptoras. Foram coletados e transferidos apenas os embriões de qualidade I e II. Foram utilizadas 58 receptoras de embriões, distribuídas aleatoriamente em três tratamentos: T1 – PBS modificado (Controle); T2 (MD1) e T3 (MD2). As taxas de gestação observadas foram: Controle = 47,4% (9/19); MD1 = 47,4% (9/19) e MD2 = 55,0% (11/20). Estes resultados demonstram que o uso de diferentes meios de manipulação não influenciou nas taxas de gestação ( $P > 0,05$ ). Deste modo, conclui-se que os meios de manipulação MD1 e MD2 podem ser utilizados nas rotinas de TE, em substituição a solução PBS modificado.

## ABSTRACT

LOPES, Flávio Guiselli, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May of 2009.  
**Different manipulation media in the viability of mice embryos and on pregnancy rate of embryo recipient cows.** Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Co-Advisers: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula, Luiz Sérgio de Almeida Camargo, João Henrique Moreira Viana and Carlos Antônio de Carvalho Fernandes.

This work aimed substitutes the usually used manipulation solution of bovine embryos on ET routines for more simple and stable medias which could be stored at room temperature. In the first experimental stage, the mice embryos used in the experiment were all at early blastocyst (Bin), compact morula grade I (Mcl) and II (MclI), randomly assigned in three treatments: T1 – modified PBS (Control); T2 (MD1) and T3 (MD2). In each treatment the embryos were kept in manipulation media for four hours. Finishing the manipulation period, the embryos were classified according the development stage and quality. Following, embryos were cultured in modified TCM 199. After the culture period, the embryos were being evaluated accordingly quality and development stage. Following were randomly selected embryo in each treatment and separated in samples to cleavage rate and morphometric, ultra-structural evaluation, cellular apoptosis and genetic expression quantification of Hsp70.3. The development rate for Bin, Mcl and MclI after maintenance for four

hours in manipulation media between was lower for Control ( $P>0.05$ ) when compared with MD1 and MD2. However, after *in vitro* culture, was not observed difference ( $P>0.05$ ) on embryo development rate among Control, MD1 and MD2. Moreover, MclI from MD2 had a higher development ( $P<0.05$ ), when compared with Control and MD1, indication a beneficial effect when MD2 is supplemented. It was not verified difference ( $P>0.05$ ) among the treatments in relation the nucleus, nucleolus, cell diameter and on total cell number cellular and apoptosis rate. In relation of embryo morphometry (diameter), there was no difference ( $P>0.05$ ) between the treatments, using embryos Bin, Mcl and MclI after maintenance followed by *in vitro* culture. Otherwise, genetic expression of Hsp70.3 had difference in Bin, Mcl and MclI after maintenance followed by *in vitro* culture among the treatments ( $P<0.001$ ). In the second experimental stage, it was tested three different manipulation media, which were used to recovery and manipulation of the embryos. The control treatment used was the modified PBS, usually used in ET routines in different animal species. The bovine embryos were transferred freshly, i.e., they were recovered from a identified donor and transferred within less than four hours to the recipient cow. Just embryos at quality I and II were recovered and transferred. Were used 58 recipient cows randomly assigned for one of the three treatments: T1 – modified PBS (Control); T2 (MD1) and T3 (MD2). As result we observed the following pregnancy rates: Control = 47.4% (9/19); MD1 = 47.4% (9/19) and MD2 = 55.0% (11/20), which did not differ among them ( $P>0.05$ ). Therefore, the manipulation media MD1 and MD2 can be used on ET routines to substitute the PBS modified solution.

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

Nos últimos anos, poucos países tiveram um crescimento tão expressivo no comércio internacional do agronegócio como o Brasil. O desenvolvimento de biotecnologias que visam aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho (NASSER, 2006), aliado à modernização da atividade rural por intermédio de pesquisas, contribuíram para transformar o país numa grande potência mundial para a produção de alimentos (GASQUES et al., 2007). Neste contexto, diversas biotecnologias aplicadas à reprodução animal, nos campos celular, molecular e genético têm sido utilizadas na pecuária bovina. Dentre elas, destaca-se a transferência de embriões (TE), uma das mais modernas e importantes atividades empregadas a campo.

A técnica possibilita que uma fêmea produza um número de descendentes superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva, permitindo a utilização de animais de valor genético que melhor expressam características econômicas importantes, como produção de leite ou carne (REICHENBACH et al., 2002). Além disso, possibilita o transporte

e comércio internacional de embriões, a formação de bancos de germoplasma, a condução de experimentos com material geneticamente semelhante em ambientes diferentes e o estudo das exigências necessárias para boa fertilidade e desenvolvimento normal de embriões (PEREIRA, 1999).

No Brasil, a atividade desenvolveu-se gradualmente, tendo início na década de 70, primeiramente utilizando-se embriões importados e, posteriormente, coletados no país. A partir da década de 90, em função do importante papel econômico e social dos rebanhos zebuínos na pecuária e do interesse nacional e internacional na aquisição e multiplicação de animais de elevado valor genético, o mercado de embriões ampliou-se bastante (FONSECA et al., 2001). Atualmente, o país ocupa posição de destaque e participação expressiva na produção mundial de embriões. Os números divulgados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) mostram que nos últimos anos o Brasil foi responsável por 17,6% da produção *in vivo* e 48,46% da produção *in vitro* de embriões bovinos no mundo (VIANA & CAMARGO, 2007).

Apesar de difundida mundialmente e de todo avanço alcançado, os resultados dos programas de TE estão aquém de seu verdadeiro potencial. Alguns fatores, como elevada variabilidade nas respostas superovulatórias, composição do meio de manipulação, manejo de doadoras e receptoras e taxas de gestação, continuam sendo obstáculos para pesquisadores e profissionais de TE. A simplificação desta técnica e a otimização dos resultados podem proporcionar a diminuição nos custos de produção dos embriões, abrindo novas alternativas e flexibilizando os programas de melhoramento e de conservação de recursos genéticos animais.

Ainda que todos os fatores sejam determinantes para o sucesso dos programas de TE, a manutenção do embrião em um meio adequado, desde a coleta até a inovulação é um ponto importante, uma vez que pode interferir na qualidade e, conseqüentemente, na viabilidade embrionária (BAVISTER, 1995). Desta forma, o meio de manipulação deve proporcionar um ambiente estável, próximo do micro-ambiente do trato reprodutivo materno, oferecendo condições para o desenvolvimento dos embriões, para que realizem a implantação e resultem em gestações viáveis (MÉNÉZO et al., 1998).

Atualmente, o meio de manipulação empregado nas rotinas de TE em bovinos têm sido o PBS modificado (WHITTINGHAM, 1971). A solução fosfatada tamponada (PBS) foi formulada por Dulbecco & Vogt em 1954 para uso em manipulação de cultivos bacterianos e, posteriormente, modificada por Whittingham em 1971, o qual adicionou várias substâncias ao meio, dentre elas a glicose (fonte energética) para a manipulação de embriões de camundongas. Com o sucesso obtido pelo pesquisador, poucos estudos foram realizados no intuito de encontrar soluções mais apropriadas e estáveis para a manipulação de embriões nas diferentes espécies animais.

O meio de manipulação deve ser o menos complexo possível e estável para que, ao longo do tempo, não sofra alterações na composição, interferindo assim, na viabilidade dos embriões. O PBS modificado (WHITTINGHAM, 1971), por exemplo, está sujeito a eventuais mudanças na composição, como variações de pH, quando armazenado por longo período de tempo em temperatura e à luz ambiente (GORDON, 1994). Portanto, o meio deve ser armazenado em local com pouca luminosidade, em ambiente refrigerado (temperatura mínima de 4°C). Quando congelado, alguns componentes como o

piruvato, se degradam espontaneamente (TAYLOR, 1984). Outros como cloreto de cálcio e cloreto de magnésio induzem a formação de precipitado (IETS, 1990).

Com base nesses aspectos, o objetivo do presente estudo foi substituir a solução de manipulação de embriões bovinos em uso na rotina de TE por meios mais simples e estáveis e, que possam ser armazenadas em temperatura ambiente.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Cultivo embrionário**

O aprimoramento das técnicas envolvidas no processo de cultivo *in vitro* de embriões têm sido de fundamental importância para o estudo e a compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário. O sucesso do sistema de cultivo de embriões "*in vitro*" está na habilidade de se imitar as condições "*in vivo*" do micro-ambiente dos órgãos genitais maternos, que são necessárias para o desenvolvimento dos embriões (VANROOSE et al., 2001). Fundamentalmente, se busca encontrar um meio ideal que mantenha a alta qualidade dos embriões, para que continue o desenvolvimento, realizem a implantação e resultem em gestações viáveis (MÉNÉZO et al., 1998).

Na maioria das espécies mamíferas a necessidade qualitativa e quantitativa de componentes que viabilizem o desenvolvimento embrionário ainda não está bem definida (IZQUIERDO et al., 1999), principalmente por não haver um vasto conhecimento das reais necessidades bioquímicas nas fases

iniciais de desenvolvimento embrionário (THOMPSON, 2000). Em seus estudos, KHURANA & NIEMANN (2000) verificaram que alterações morfológicas e moleculares podem ser causadas pelo cultivo *in vitro*, sendo responsáveis pela menor qualidade e, conseqüentemente, menor viabilidade após inovulação ou criopreservação de embriões.

Assim, as condições de cultivo *in vitro* são consideradas muito importantes para que os bons índices de produção de embriões sejam alcançados, razão pela qual, inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando avaliar o efeito que diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos (substratos energéticos, tampões, macromoléculas, antioxidantes, condições de atmosférica gasosa e temperatura) possam exercer sobre o metabolismo e a capacidade de desenvolvimento de embriões (RIEGER, 1992).

Os embriões podem secretar diversos compostos com concentrações variáveis, de acordo com suas especializações, nutrição ou tempo de manipulação. Segundo DONNAY & LEESE (1999) os substratos energéticos, como piruvato, glicose, lactato e aminoácidos, desempenham relevante papel no desenvolvimento embrionário e, por isso são utilizados nos diferentes meios de cultivo de embriões. Em alguns estudos, pesquisadores verificaram que o desenvolvimento embrionário é reduzido quando na ausência desses substratos (KIM et al., 1993; ROSENKRANS et al., 1993).

O piruvato é utilizado pelo embrião ao longo do seu desenvolvimento (GARDNER & LEESE, 1986), com um aumento das necessidades após a blastulação, sendo esse aumento essencial para a viabilidade do blastocisto (DORLAND et al., 1992). No entanto, RIEGER (1992) e MARTIN & LEESE (1995) mostraram que do piruvato captado pelo embrião, 44% são

metabolizados no estágio de duas células e 17% pela mórula, quando a glicose passa a ser o substrato predominantemente utilizado, enquanto que em fases anteriores do desenvolvimento, o consumo de glicose é mínimo. O blastocisto utiliza apenas 29% do piruvato captado, enquanto nessa etapa, 44% da glicose captada é convertida em lactato (GARDNER & LEESE, 1990). Além disso, a taxa entre piruvato lactato é essencial para o balanço do potencial oxidação/redução (MORALES et al., 1999).

Outro papel desempenhado pelo piruvato no desenvolvimento embrionário foi sugerido por BUTCHER et al. (1998), onde poderia ser convertido em alanina e atuar na remoção de amônia do embrião. Além disso, o piruvato desempenha uma função de proteção parcial ao blastocisto, degradando o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) exógeno e protegendo o embrião do estresse oxidativo (MORALES et al., 1999).

A glicose contribui com apenas 17% da produção de ATP produzido pelo embrião, enquanto a oxidação do piruvato é responsável por 40% do ATP produzido (HOUGHTON & LEESE, 2004). A captação e utilização de glicose é vital para a sobrevivência e desenvolvimento do embrião durante o período de pré-implantação. Esse período se estende desde a fertilização até o estágio de blastocisto, sendo que o decréscimo na captação de glicose durante esse estágio pode comprometer o desenvolvimento embrionário (RILEY & MOLEY, 2006).

A síntese de lactato foi detectada desde o estágio de uma célula até blastocisto, sugerindo que o embrião possui, desde o estágio inicial, a maquinaria completa de enzimas glicolíticas (BAVISTER, 1995). (Figura 1). O metabolismo de glicose em fases embrionárias iniciais está relacionado à

síntese de uma ou mais enzimas glicolíticas pelo genoma do embrião, que é ativado na fase de blastocisto. A glicólise é funcional na fase de blastocisto quando há uma demanda de energia necessária pra a compactação, expansão e formação de blastocele. A utilização dessa via de produção de energia pelo embrião pode ser um reflexo de estresse metabólico ou de longo tempo submetido a condições subótimas (KHURANA & NIEMANN, 2000).

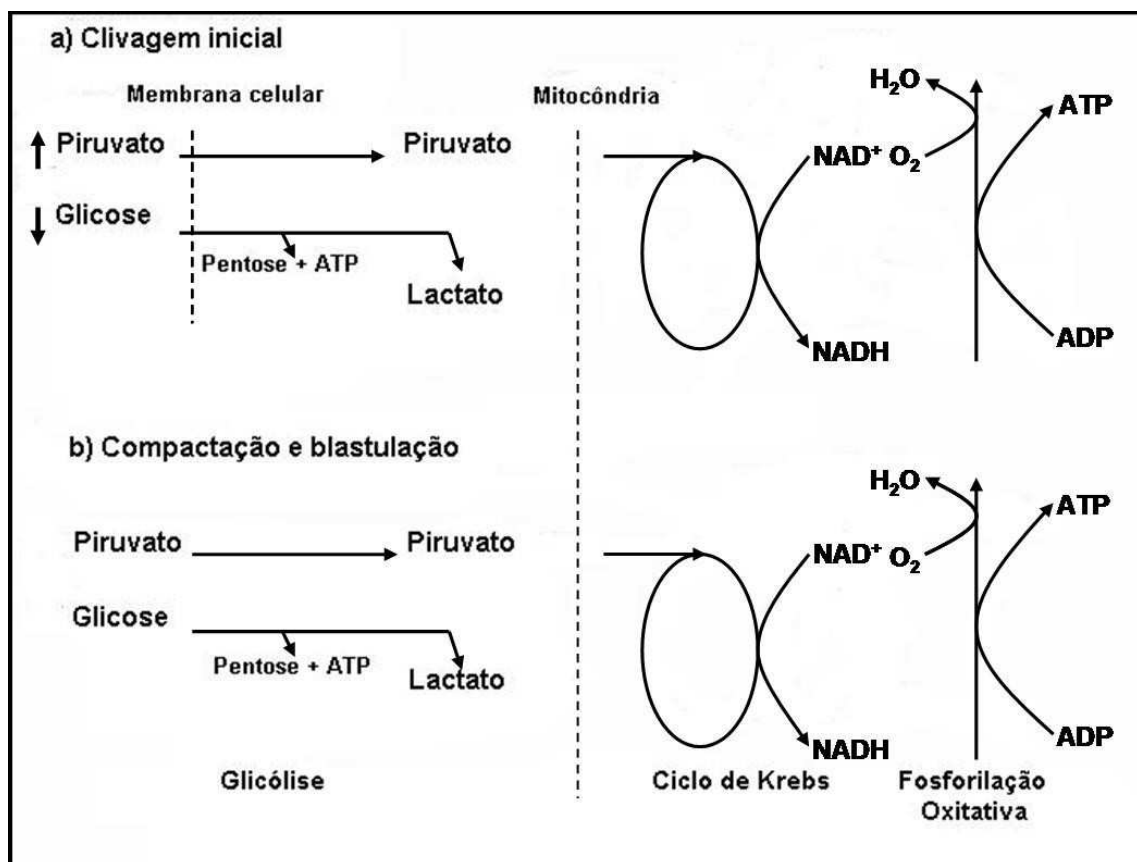


Figura 1. Representação das diferenças na via metabólica entre os estádios de clivagem inicial, compactação e blastulação em embriões (GOMES, 2006).

Os aminoácidos são considerados fundamentais para a formação do blastocisto e servem como reguladores do pH, tendo funções importantes na síntese de proteínas (ROSENKRANS & FIRST, 1994) e no controle da osmolaridade intracelular (VAN WINKLE et al., 1990).

O uso de sistemas-tampão, como bicarbonato de sódio e fosfato no meio de cultivo é responsável pela minimização de possíveis flutuações de pH no meio, pois se sabe que variações de pH no meio refletem no pH do embrião. Assim, havendo variação de pH no meio de cultivo, dependendo da amplitude, a viabilidade embrionária será afetada (BAVISTER, 1995). O pH do meio é crítico para a eficiência de muitos eventos e reações bioquímicas que envolvem equilíbrio ácido-base, influenciando no desenvolvimento embrionário (VAJTA et al., 1997). O pH para maturação (DOWNS & MASTROPOLO, 1997) e para cultivo de embriões (VAJTA et al., 1997) deve estar entre 7,3 e 7,5.

A albumina sérica bovina (BSA), assim como o soro fetal bovino (SFB) são as fontes protéicas mais comumente utilizadas como suplemento para os diferentes meios de cultivo de embriões (MINGOTI, 2000). A BSA é utilizada como fonte de proteína em meios de cultivo e, também por promover efeitos benéficos durante o desenvolvimento embrionário. A BSA possui capacidade de quelar metais pesados, equilibrar o pH (MEHTA & KIESSLING, 1990) e, ainda possui propriedade surfactante que previne a adesão de embriões a superfícies plásticas e de vidro (PINYOPUMMINTR & BAVISTER, 1994).

Os antioxidantes nos meios de cultivo têm como finalidade retardar ou desativar certas partículas chamadas de radicais livres que afetam moléculas e células podendo causar tanto danos às membranas e estruturas quanto ao material genético (CAVALCANTI NETO, 2004). O ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), por exemplo, quando adicionado, controla a morte celular (estresse oxidativo) e melhora a qualidade de embriões caprinos (LEE et al., 2000), bovinos (LIM & HANSEL, 2000) e suínos (WANG & DAY, 2002). Além disso, apresenta capacidade de quelar metais pesados e íons

orgânicos (THOMPSON, 2000), os quais normalmente inibem o desenvolvimento embrionário “*in vitro*” (SCHIEWE et al., 1985).

A atmosfera gasosa no meio de cultivo *in vitro* está intimamente relacionada com o processo de fosforilação oxidativa, principal função da mitocôndria, que produz a maioria da adenosina trifosfato (ATP) utilizada pelo embrião. Os embriões são dependentes deste processo, utilizando-o como fonte energética para a síntese protéica, atividade de bomba sódio-potássio que forma potencial osmótico através do trofotoderma, produzindo a blastocela (THOMPSON et al., 1996). O aumento da demanda de ATP causa um aumento no consumo de substratos como oxigênio, piruvato, glicose (THOMPSON et al., 1996) e aminoácidos (PARTRIDGE & LEESE, 1996). A atmosfera gasosa ( $O_2$ ) *in vivo* normalmente encontrada em oviduto de mamíferos varia entre 3,5 a 8,5%, portanto, *in vitro*, as altas concentrações de  $O_2$ , exercem efeitos deletérios sobre o desenvolvimento embrionário (VAN SOON et al., 1997).

Além disso, a variação de temperatura (estresse térmico) no cultivo *in vitro* é responsável por alterações específicas nos mecanismos termoregulatórios do embrião, interferindo na qualidade e no desenvolvimento embrionário (NEUER et al., 1999). Essa exposição resulta na elevação da síntese de um grupo específico de proteínas, as quais são denominadas de proteínas do choque térmico – Hsp (PAULA-LOPES & HANSEN, 2002; RIVERA et al., 2004). Dentre as funções exercidas pelos genes das Hsp estão incluídas a modulação da atividade de proteínas; a regulação da degradação de proteínas; o transporte das mesmas através das organelas, além de assegurar a conformação correta das proteínas (TAKAYAMA et al., 2003)

funcionando como chaperonas (FEHRENBACH & NIESS, 1999). A temperatura adequada para o cultivo *in vitro* de embriões deve estar o mais próximo da temperatura fisiológica do animal (LENZ et al., 1983).

### **2.1.1 Meios de manipulação**

A melhoria do meio de manipulação utilizado nas rotinas de TE deve proporcionar não apenas o aumento do número de embriões viáveis, mas também a diminuição do estresse, que pode impedir o desenvolvimento embrionário normal. Para GORDON (1994); BAVISTER (1995), o curto tempo de exposição do embrião ao meio de manipulação, no máximo quatro horas, é suficiente para a ocorrência de alterações morfológicas e moleculares no embrião.

Atualmente, o meio de manipulação mais empregado nas rotinas de TE em bovinos têm sido o PBS modificado (WHITTINGHAM, 1971). A solução fosfatada tamponada (PBS) foi formulada primeiramente por Dulbecco & Vogt em 1954 para uso em manipulação de cultivos bacterianos e, posteriormente, modificada por Whittingham em 1971, o qual adicionou várias substâncias ao meio, dentre elas a glicose (fonte energética) para a manipulação de embriões de camundongas. Com o sucesso obtido pelo pesquisador, poucos estudos foram realizados no intuito de encontrar soluções mais apropriadas e estáveis para a manipulação de embriões nas diferentes espécies animais.

Segundo VAN LANGENDONCHT et al. (1997), o meio PBS modificado (WHITTINGHAM, 1971) pode ser enriquecido com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA) variando de 1 a 20%. Dentre as inúmeras pesquisas realizadas, onde o PBS modificado (WHITTINGHAM, 1971) foi

utilizado, AZEVEDO et al. (1993); BORGES et al. (1993); MOLINA & SATURNINO (1993), ALMEIDA & DUARTE (1996) e FREITAS et al. (1997) trabalhando com transferência de embriões bovinos a fresco, observaram taxas de gestação de 82,0 (34/41), 64,24 (38/58), 65,0 (24/58), 57,10 (06/08) e 64,5% (144/227), respectivamente.

Adicionalmente, CARNEVALE et al. (1987); CARNEY et al. (1991) e SQUIRES et al. (1999), utilizaram o meio PBS modificado (WHITTINGHAN, 1971) em transferência de embriões eqüinos a fresco e, verificaram taxas de gestação de 85,0 (34/40); 64,42 (67/104) e 67,80% (232/342), respectivamente. BAGUISI et al. (1997) utilizando embriões ovinos a fresco, registraram taxa de gestação de 75% (06/08). Na espécie eqüina já existem trabalhos que sugerem sucesso no uso de meios mais simples e estáveis na manipulação embrionária. Entretanto, os estudos ainda não são conclusivos pela ausência concomitante de grupo testemunha, uso do meio PBS modificado (WHITTINGHAN, 1971).

## **2.2 Desenvolvimento embrionário**

O estudo básico da morfologia do desenvolvimento embrionário de mamíferos, especialmente de camundongas e de bovinos teve início a partir da década de 40. Nas espécies mamíferas, muitos eventos importantes ocorrem durante o desenvolvimento embrionário, desde a fase de zigoto até a formação do blastocisto. Isto inclui a primeira clivagem; a ativação do genoma embrionário, no estágio de duas células para camundongas (WHITTINGHAM & BIGGERS, 1967; BAVISTER, 1988) e 8-16 células para bovinos (KANKA et al., 2003); a compactação da mórula e a formação do blastocisto, que estabelece a diferenciação de dois tipos celulares, trofoblasto (TF) e massa celular interna

(MCI). O TF é composto por células externas do blastocisto que originam as membranas extra-embrionárias, enquanto que as células da MCI originam o feto e contribuem em parte, para a formação das membranas extra-embrionárias (LONERGAN et al., 2003).

O desenvolvimento de embriões na fase de pré-implantação é caracterizado por três fases transitórias que ocorrem após a fecundação: a transição do controle genômico do oócito para o embrião, a compactação celular e a diferenciação da mórula para blastocisto. Estes processos, por sua vez, são regulados inicialmente por genes transcritos e proteínas sintetizadas durante a oogênese (transcritos maternos), antes do estágio em que o genoma embrionário é ativado (MOHAN et al., 2002). Em seguida, ocorre a ativação do genoma embrionário, que é acompanhada por mudanças globais na expressão gênica, imposta pela formação de estados de repressão transcricional (KANKA et al., 2003). No decorrer das primeiras clivagens, o controle do desenvolvimento é tomado pela expressão de porções do genoma embrionário, sendo os transcritos e as proteínas maternos gradualmente degradados (HYTTEL et al., 1997). Existem ainda genes expressos no estágio de blastocisto e não no estágio de mórula, que são responsáveis pelos processos que ocorrem na fase de diferenciação celular e implantação, um evento do desenvolvimento que tem alta percentagem de mortalidade embrionária (PONSUKSILI et al., 2002). Assim, o desenvolvimento embrionário depende do sucesso em controlar os momentos temporal e espacial da expressão após a ativação do genoma embrionário, ou seja, qualquer modificação nas condições de cultivo pode afetar um ou todos estes processos, tendo efeito sobre a qualidade embrionária (RIZOS et al., 2003).

### **2.2.1 Período pré-implantacional**

Em camundongas, a primeira clivagem do zigoto formado ocorre 24 a 38 horas após o acasalamento e a segunda divisão 38 a 50 h após o acasalamento (WHITTEN & DAGG, 1961). Deste ponto em diante, a divisão dos blastômeros passa a ser um evento assincrônico e intenso, razão pela qual é possível observar em estádios iniciais um número ímpar de células. A partir de 8-16 células o embrião de camundonga é considerado como mórula inicial (LEWIS & WRIGHT, 1935; WHITTEN & DAGG, 1961), apresentando uma massa de células com separação nítida entre os blastômeros e ocupando quase toda a totalidade do espaço perivitelínico (IETS, 1998). GARBUTT et al. (1987) em seus estudos com camundongas verificou que os blastômeros que se dividem mais precocemente são os que mais contribuem para a formação da massa celular interna (MCI). As células maiores geralmente formam as células externas (membranas extra-embriônicas) e as menores as células internas, que originarão o feto (MASSIP et al., 1983).

O estágio de mórula compacta (Mc) é caracterizado com aproximadamente 32 a 64 células nos bovinos (SENGER, 2003) e até 32 células nas camundongas (SUWINSKA, 2008), agregados entre si, formando uma massa compacta que ocupa 60-70% do espaço perivitelínico (IETS, 1998). Neste estágio, o embrião de camundonga se apresenta com 70 µm de diâmetro (diâmetro externo contando com a zona pelúcida) (WHITTINGHAM, 1974). A compactação é considerada um dos sinais de diferenciação embrionária (WATSON & BARCROFT, 2001). Ainda assim, os blastômeros

continuam com sua capacidade totipotente (SENGER, 2003). Os eventos celulares relacionados com a compactação compreendem o desenvolvimento da adesão celular dependente de cálcio; o estabelecimento das junções tipo *gap* mediadas pela comunicação interblastomérica; a iniciação do contato celular induzido pela polarização das células e o aparecimento de junções tipo *tight* (WATSON & BARCROFT, 2001).

O estágio de blastocisto inicial (Bin) é apresentado com aproximadamente 100-200 células nos bovinos (SENGER, 2003) e pode variar de 28 a 34 células nas camundongas (SMITH & McLAREN, 1977) e, é caracterizado pelo início do transporte de fluido nas células trofoectodérmicas e pela formação de uma cavidade, a blastocèle, no interior do embrião (WATSON & BARCROFT, 2001). O Bin ocupa cerca de 70 a 80% do espaço perivitelínico (IETS, 1998). Neste estágio, o embrião bovino se apresenta com 160 a 180 µm de diâmetro (diâmetro externo contando com a zona pelúcida) (LINARES & KING, 1980), sendo possível diferenciar o trofoderma (TF) da massa celular interna (MCI) (SENGER, 2003).

O TF é o primeiro tipo celular a se diferenciar, formando a camada mais externa do blastocisto que tem a função de, entre outras finalidades, iniciar o contato com o endométrio materno, propiciando a implantação. Para isso, é necessário que ocorra a polarização celular caracterizada pelo estabelecimento de componentes da superfície celular; pela distribuição assimétrica de proteínas de membranas; pelos componentes específicos no citoplasma e pela migração basal das mitocôndrias e vesículas lipídicas (WATSON & BARCROFT, 2001). Assim, o TF adquire capacidade de iniciar e regular os eventos de cavitação, pela expressão de produtos de genes que facilitam o

transporte e a retenção de fluido na cavidade blastocística nascente (WATSON et al., 2004).

O estágio de blastocisto (BI) é apresentado com um número de células semelhante ao Bin, sendo que a blastocele é bem visualizada e predominante, além da marcada diferenciação entre as células trofoblásticas (IETS, 1998), formando uma camada que se encontra aderida à zona pelúcida (ZP) e a MCI (WATSON & BARCROFT, 2001).

O blastocisto expandido (Bx) é caracterizado com mais de 200 células nos bovinos (SENGER, 2003) e no máximo 100 a 120 células nas camundongas (AUSTIN & SHORT, 1982; O'FARRELL, 2004). O seu diâmetro é aumentado consideravelmente (1,2 a 1,5 vezes) e, como consequência, há a diminuição da espessura da zona pelúcida em 1/3 de sua espessura inicial (IETS, 1998). Neste estágio, o embrião de camundonga pode variar de 94-114 µm de diâmetro (diâmetro externo contanto a zona pelúcida) (CHUNG, 1973). A pressão crescente do blastocisto em desenvolvimento provoca a ruptura da zona pelúcida, iniciando assim, o processo de eclosão (WATSON & BARCROFT, 2001). Por fim, no estágio de blastocisto eclodido (Bec), onde o número de células pode variar de 200 a 800 células nos bovinos, os embriões já se encontram fora da zona pelúcida, apresentando blastocele bem definida ou colabada (SENGER, 2003).

## **2.3. Apoptose**

### **2.3.1 Apoptose ou morte celular programada**

A palavra apoptose (do grego *apo* = separação, *ptôsis* = queda) (MCP), foi adotada pela primeira vez na década de 70 (KERR et al., 1972), em

analogia ao fenômeno natural das folhas caírem das árvores ou das pétalas caírem das flores. Este termo designa um processo de morte celular auto dirigida e distinta, onde a morte de uma célula não leva à morte de outras células (WEIL et al., 1996).

A morte celular por apoptose também conhecida como morte celular programada (MCP) é um processo fisiológico extremamente regulado e de grande importância para a homeostase de organismos multicelulares (SARASTE & PULKKI, 2000). Este processo é regulado por expressões genéticas decorrentes da interação célula e meio externo, que levam a produção de várias moléculas com atividades específicas e que resultam em alterações celulares funcionais (ISRAELS & ISRAELS, 1999).

A apoptose em células embrionárias tem recebido atenção especial de muitos pesquisadores, devido o seu importante papel na reprodução e no desenvolvimento de mamíferos (JACOBSON et al., 1997). O estudo da apoptose fornece novas informações do processo fisiológico que ocorre durante o desenvolvimento do embrião, que podem ajudar na produção de embriões de melhor qualidade e, conseqüentemente na viabilidade embrionária (COUTINHO et al., 2007). Além disso, serve como um importante indicador de ambiente inadequado, das subcondições de desenvolvimento ou estresses, para embriões tanto *in vivo* como *in vitro* (BETTS & KING, 2001).

Em embriões no estágio pré-implantacional de mamíferos, a apoptose pode ser considerada um processo normal (BYRNE et al., 1999). Entretanto, quando o número ou razão de células apoptóticas por células normais aumenta, esse evento torna-se prejudicial ao desenvolvimento embrionário (GJORRET et al., 2003), interferindo em sua qualidade (LEVY et al., 2001). Em

embriões produzidos *in vitro* a incidência de apoptose é maior do que *in vivo*, provavelmente devido ao estresse provocado pelo cultivo *in vitro* (KNINJ et al., 2005).

A viabilidade dos embriões no estágio pré-implantacional não depende somente de condições adequadas para o normal desenvolvimento, depende também da aquisição de mecanismos com os quais os embriões lutam contra as adversidades. A habilidade do embrião em resistir ao estresse é provavelmente regulada por diversos fatores que permitam o acontecimento da apoptose e de mecanismos protetores envolvendo genes estresses-induzido (BETTS & KING, 2001).

Assim, as possíveis causas de apoptose em embriões podem estar relacionadas a anormalidades do cromossomo ou núcleo (HARDY, 1999), ao potencial de desenvolvimento inapropriado (HANDYSIDE & HUNTER, 1986), a falta ou excesso de fatores de crescimento (IGF-1, IGF-2 e hormônios) (HARDY & SPANOS, 2002) e a exposição a fatores que causam danos às células, como radiação ultravioleta ou estresse térmico (HERRLER et al., 1998; PAULA-LOPES & HANSEN, 2002). Em embriões produzidos *in vitro* a apoptose pode ser aumentada por subcondições de cultivo, resultante de inadequadas composições dos meios ou da densidade de embriões no meio de cultivo (O'NEIL, 1998).

### **2.3.2 Alterações morfológicas e bioquímicas**

A morte celular por apoptose pode ser caracterizada por uma série de alterações morfológicas marcantes e coordenadas (GRIVICICH et al., 2007), as quais incluem diminuição do volume citoplasmático, alteração da

permeabilidade mitocondrial, condensação da cromatina, seguida da fragmentação internucleossomal do DNA e de modificações no citoesqueleto, com a formação de vacúolos citoplasmáticos (MELO et al., 2000; PLAETZER et al., 2005). Por fim, ocorre à formação de corpos apoptóticos que impedem a liberação da matriz intracelular no meio extracelular, sendo rapidamente reconhecidos, englobados e degradados por fagócitos e/ ou células adjacentes (MATWEE et al., 1999).

A alteração bioquímica mais associada a apoptose é a ativação de enzimas proteolíticas que, por sua vez, ativam as DNases mediadoras da fragmentação do DNA cromossômico, bem como a lise de substratos específicos de proteínas, que determinam a integridade e a forma do citoplasma (SARASTE & PULKKI, 2000) Estas DNases endógenas cortam as regiões internucleossomais em fragmentos de 180 à 200 pares de bases (pb) expondo a extremidade 3' da fita de DNA (DIDENKO & HORNSBY, 1996).

### **2.3.3 Vias de ativação da apoptose**

O processo de ativação da apoptose pode ocorrer basicamente por duas maneiras: a via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial).

#### **2.3.3.1 Via extrínseca**

A via extrínseca pode ser desencadeada através dos receptores de morte presentes na superfície celular, que são ativados em resposta ao acoplamento de ligantes específicos. A maioria identificada dos receptores da morte são membros da superfamília de receptores para o TNF (fator de necrose tumoral) e são caracterizados por apresentar porção extracelular rica

em cisteína e uma região citoplasmática chamada “domínio de morte” (*death domain*), essencial para transdução intracelular para o sinal de morte. Entre esses receptores, um dos mais estudados e melhor caracterizados é o receptor Fas (CD95 ou APO-1). Quando o ligante-Fas se acopla ao receptor Fas, as moléculas individuais do receptor se trimerizam (formação de agregados de cadeia da morte), permitindo que as mesmas se liguem a uma proteína adaptadora presente no citoplasma, chamada domínio de morte associada ao Fas (“Fas - associated death domain”, FADD) (PAROLIN & REASON, 2001).

Após a ligação desse complexo à pro-caspase 8 ocorre a ativação dessa enzima por clivagem proteolítica. Assim, a caspase 8 pode então, diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase 3, que levará a execução da apoptose (GREEN & EVAN, 2002).

### **2.3.3.2 Via intrínseca**

A via intrínseca pode ser desencadeada por sinais de estresse intracelular que resultam em disfunção mitocondrial, tais como lesão do DNA (via gene p53), alteração nas vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH, estresse oxidativo), drogas, toxinas ou privação dos fatores de crescimento (PAROLIN & REASON, 2001). Assim, os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER, 2000).

A mitocôndria tem papel fundamental na manutenção de funções celulares vitais, sendo responsável pela respiração celular e síntese de ATP, regulação osmótica, controle do pH e modulação do estado redox da célula (KAPLOWITZ, 2000). Quando os sinais de morte alcançam a mitocôndria,

levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna, bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Ao mesmo tempo, a água do espaço entre as membranas passa para a matriz mitocondrial, levando a ruptura da organela e, conseqüentemente a liberação de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bid) para o citoplasma. Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, ocorre à perda da homeostase celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS). O aumento nos níveis de EROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso da membrana mitocondrial interna. A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose, induzindo a ativação das caspases 9 e 3 (GOTTLIEB et al., 2000).

Durante a apoptose ocorre a abertura de um poro existente na membrana mitocondrial interna, chamada poro de transição de permeabilidade mitocondrial (“mitochondrial permeability transition pore”, MPTP) (PESSAYRE et al., 1999). Através desse poro ocorre a liberação do citocromo C para o citoplasma. Quando no citoplasma, o citocromo C forma um complexo com o fator ativador da apoptose 1 (APAF-1), que promove a ativação da pró-caspase 9, formando o complexo apoptossômico, responsável pela ativação da caspase 9 e, conseqüentemente a ativação da pró-caspase 3 que executa o processo de apoptose (SCHULTZ et al., 2000).

Em estudos recentes, PANDEY et al. (2000) e SALEH et al. (2000) demonstraram que diversas proteínas do estresse térmico podem ser capazes de regular os eventos apoptóticos de maneira positiva ou negativa. A proteína Hsp27, por exemplo, pode se ligar ao citocromo C, diminuindo seus níveis na

célula para a formação do complexo apoptossômico. Já, as proteínas Hsp70 e Hsp90 podem se ligar diretamente com a APAF-1, impedindo a formação do complexo apoptossômico.

### **2.3.4 Mecanismos de ativação da apoptose**

Existem duas principais famílias de proteínas que estão envolvidas na regulação do processo de apoptose celular, aquelas responsáveis pela clivagem proteolítica, a família das caspases e, aquelas que regulam a atividade das caspases, a família da Bcl-2.

#### **2.3.4.1 Caspases**

O envolvimento das caspases na apoptose foi inicialmente estudado por Ellis et al. em 1991, observando a regulação do programa de morte celular durante o desenvolvimento do nematódeo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Atualmente, cerca de 14 tipos de caspases foram identificadas em mamíferos, sendo que a grande maioria participa do processo de apoptose (RUPNARAIN et al., 2004).

As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem à família das cisteíno proteases, que possuem uma cisteína no sítio ativo e que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuem resíduos de ácido aspártico (NICHOLSON, 1999). Tais substratos incluem as proteínas envolvidas no reparo de danos e na replicação do DNA, no ciclo celular, na sinalização de transdução e na manutenção da integridade da estrutura celular. Assim, quando esses alvos são atacados, o reparo não acontece, levando a desestruturação da célula (THOMPSON, 1999).

As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados pró-caspases (SPANOS et al., 2002). Uma vez ativadas, a maioria das caspases tem a habilidade de promover a ativação de múltiplos membros da família das caspases e a clivagem proteolítica de diversos tipos de proteínas celulares, que contribuem para o controle da morte celular (MURPHY & MARTIN, 2003).

As caspases envolvidas no processo de apoptose podem ser consideradas iniciadoras ou efetoras. As caspases iniciadoras estão envolvidas na iniciação da cascata proteolítica (caspases 1, 2, 8, 9 e 10) e são responsáveis pelo processamento e ativação das efetoras. As caspases efetoras são responsáveis pela clivagem proteolítica (caspases 3, 6 e 7) e pelas mudanças nas características morfológicas e bioquímicas (RUPNARAIN et al., 2004).

#### **2.3.4.2 Proteínas da família Bcl-2**

A Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte celular por apoptose que participam ativamente da regulação da apoptose (BORNER, 2003). Pelo menos 15 membros dessa família já foram identificados nos mamíferos. Esta família pode ser dividida em dois subgrupos, as proteínas consideradas antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 e A1), localizadas principalmente no envelope nuclear e no retículo endoplasmático e as pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bok, Bik, Blk, Hrk, Bnip<sub>3</sub>, Bim, Bad, Bid, Bcl-X<sub>s</sub>), localizadas na membrana da mitocôndria (JEONG et al., 2005).

A homeostase é mantida pelo controle da quantidade de proteínas pró e antiapoptóticas (SPANOS et al., 2002). As proteínas antiapoptóticas inibem a apoptose diretamente (bloqueando as caspases) e indiretamente (impedindo a liberação do citocromo C). O citocromo C é uma importante proteína que participa da ativação da apoptose via alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (PEREZ et al., 2007). O mecanismo de liberação do citocromo C pela mitocôndria ainda não está esclarecido, entretanto, sabe-se que é desencadeado por fatores de estresses intracelulares e alterações nas concentrações de proteínas pró e antiapoptóticas. O fator de indução apoptótico (AIF) também é liberado pela mitocôndria, translocando-se para o núcleo induzindo a condensação e fragmentação nuclear (CHANG & YANG, 2000).

### **2.3.5 Ocorrência de apoptose**

#### **2.3.5.1 Estádio de clivagem e compactação**

O processo de apoptose em embriões de desenvolvimento normal não ocorre antes da ativação do genoma embrionário (AGE). O tempo de AGE varia entre as espécies mamíferas. Nas camundongas, o principal evento na ativação ocorre durante o estágio de 2 células (FLACH et al., 1982), enquanto em humanos e suínos a ativação ocorre entre o estágio de 4-8 células (BRAUDE et al., 1988) e entre 8-16 células em bovinos (TELFORD et al., 1990).

#### **2.3.5.2 Blastocisto**

Todas as espécies mamíferas apresentam seu mais alto grau de apoptose espontânea no estágio de blastocisto. Em uma variedade de espécies a morte celular é observada somente durante o estágio de blastocisto e, ocorre predominantemente na massa celular interna (MCI) (JURISICOVA et al., 1995). A extensão e regulação da morte celular durante o estágio de pré-implantação é aparentemente crítica para os estágios mais tardios do desenvolvimento embrião (BRISON & SCHULTZ, 1997). Mudanças morfológicas podem ser observados em 70-80% dos blastocistos de camundongos e humanos produzidos *in vitro* e *in vivo* (HARDY, 1997) e praticamente todos os blastocistos bovinos produzidos *in vitro* e *in vivo* (BYRNE et al., 1999).

### **2.3.6 Detecção de apoptose**

A detecção de apoptose em células embrionárias tem sido utilizada como um critério adicional na avaliação morfológica, com o objetivo de assegurar a qualidade e a viabilidade embrionária (COUTINHO et al., 2007). O teste TUNEL (Terminal transferase mediated Uracil Nick End Labeling) pode ser utilizado na detecção *in situ* de células apoptóticas, pela marcação do DNA fragmentado em regiões específicas (internucleossomais), gerado pela atividade endógena da DNase. Este método é composto pela enzima transferase deoxinucleotidil terminal (TdT) que catalisa e transfere o nucleotídeo dUTP (conjugado de fluoresceína) para a região livre do grupo 3' hidroxil, presente em fitas fragmentadas de DNA (PAULA-LOPES & HANSEN, 2002).

## 2.4 Proteínas do choque térmico (Hsp)

As proteínas de choque térmico (Hsp - Heat shock proteins) são estruturas ubíquas e conservadas na evolução das espécies. Elas são sintetizadas por uma grande variedade de seres vivos (LOTTERMANN et al., 2003), sendo identificada primeiramente na glândula salivar de *Drosophila melanogaster* após a aplicação de choque térmico (RITOSSA, 1962). Atualmente, esta resposta é associada a uma síntese abrupta de moléculas conhecidas como proteínas de estresse. Vários agentes, ao gerarem estresse celular, podem induzir a síntese de Hsp. Além do choque térmico por temperatura, a exposição das células a metais pesados, anaerobiose, etanol, diversos ionóforos, análogos de aminoácidos e infecções podem deflagrar alterações no padrão da expressão gênica e na síntese de proteínas específicas (LINDQUIST & CRAIG, 1998).

A expressão de Hsp também pode ser induzida por estresse oxidativo, mecânico e por citocinas (FEHRENBACH & NIESS, 1999). Muitos destes agentes estressantes têm em comum a capacidade de afetarem de modo adverso a conformação correta e, conseqüentemente, a função das proteínas (MINOWADA & WELCH, 1995).

Nas condições em que proteínas incorretamente dobradas se acumulam nas células, começa uma resposta ao estresse ou resposta ao choque térmico (Hsr - Heat shock response). Esta se inicia pela ativação de um fator específico de transcrição, chamado Hsf-1 (Heat shock factor, ou fator do choque térmico). Segundo MEYER & DA SILVA (1999), tal fator estaria presente na célula normal

e não estressada como um monômero inativo. Em resposta ao estresse metabólico, rapidamente sofreria trimerização, o que tornaria possível sua ligação imediata a uma seqüência de nucleotídeos, chamada de Hse (Heat shock element, ou elemento do choque térmico), localizada dentro da região promotora dos genes que codificam as Hsp, tudo resultando em alto nível de transcrição dos genes do choque térmico. As células quando submetidas ao estresse, podem sobreviver ou morrer, estando na dependência do tipo celular, do tipo e intensidade do estresse e de outros fatores. A exposição prévia das células a estresses não mortais pode suscitar a resposta ao choque térmico (Hsr), com a síntese de Hsp. Porém, se houver uma nova exposição das células a estresses, as células se tornam tolerantes a agressões, produzindo menos lesões, ou seja, as células que sintetizaram as Hsp ficam protegidas contra novas exposições, o que reflete em menores lesões também no organismos ou em partes deles (LINDQUIST & CRAIG, 1998).

As Hsp não são induzidas apenas em condições de estresse. Há componentes desta classe protéica conhecidas como Hsc (Heat shock cognates) (FEIGE & POLLA, 1994) que são expressos constitutivamente, isto é, dentro da vida normal dos organismos, não submetidos à condições de estresse (FULLER et al., 1994). Além disso, seu grau de expressão parece ser dependente da atividade metabólica celular, ou seja, o aumento da expressão de Hsp ocorre provavelmente devido ao aumento da demanda celular por síntese protéica e eventos secretores (WELCH, 1992). O principal mecanismo de ação das Hsp, além de conferir proteção, seria o de atuarem como chaperonas moleculares.

Diversas Hsp têm sido descritas em mamíferos, sendo classificadas em cinco famílias de acordo com seu peso molecular (VIERLING, 1991). As Hsp podem ser agrupadas em Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp104 (SCHARF et al., 1998). Algumas existem de forma constitutiva, como as Hsp de 70 kilodaltons (kDa). Por sua vez, as Hsp60 e Hsp90 têm seus níveis drasticamente aumentados quando a célula sofre estímulo metabólico. Na medida em que ocorre o choque térmico e outras condições estressantes, provocando um efeito de desdobramento parcial das proteínas celulares, a capacidade das Hsp de proteger as células contra os efeitos adversos do estresse torna-se uma extensão lógica de sua função como chaperonas (BECKER & CRAIG, 1994). As funções das Hsp incluem: modulação da resposta de receptores protéicos (Hsp90); transporte intracelular e translocação de peptídeos (Hsp60); formatação de proteínas nascentes (Hsp60 e Hsp70) e degradação protéica (ubiquitina). Portanto, fica evidente o papel das Hsp na regulação do metabolismo, do crescimento e da diferenciação celular, além de rapidamente se adaptar a funções de reparo e degradação de proteínas danificadas (MÖLLER, 1991; MORIMOTO, 1998).

#### **2.4.1 Família Hsp70**

A família da Hsp70 tem como função desagregar e reativar as proteínas termicamente danificadas, além de auxiliar no correto dobramento e estabilização de polipeptídios recém-formados, antes destes assumirem seus estados nativos. Em função destas características, as Hsp70 são conhecidas como chaperonas moleculares (ESSIG & NOSEK, 1997). As Hsc70 são encontradas em níveis relativamente altos na maioria das células, em presença

de estresse e da desnaturação de proteínas, assim, as Hsc70 migram para o núcleo e nucléolo, onde se ligam a pré-ribossomas desnaturados ou que ainda não tenham adquirido a conformação nativa. Com isso, acredita-se que Hsc70 e Hsp70 auxiliem na estabilização de proteínas, sendo que a primeira agiria regularmente, em condições não estressantes, enquanto a segunda seria sintetizada para atender as demandas extras impostas à célula sob estresse (ESSIG & NOSEK, 1997).

As Hsp70 são genes expressos em níveis semelhantes em todas as células, ou seja, um gene constitutivo, e sua expressão é reflexo de estresse celular (PEDERSEN et al., 2005). Evidências sugerem que a Hsp70.1 e 70.3 desempenham um importante papel no processo de fertilização e no desenvolvimento embrionário (DIX et al., 1998; WRENZYCKI et al., 2005).

Para PEDERSEN et al. (2005), a expressão gênica embrionária pode ser modificada em resposta a alterações do ambiente, o que provavelmente é uma tentativa do embrião para estabilizar sua função celular. A exposição a situações de estresse ocasiona alterações ultraestruturais observadas em oócitos e embriões, dentre as quais, estão a redistribuição de organelas na região cortical e agregação citoplasmática, vacuolização e rompimento da membrana e/ou matriz mitocondrial, culminando num processo de apoptose e morte celular. A habilidade em regular a morte celular tem sido reconhecida como uma das funções das Hsp70, podendo contribuir com seu efeito protetor nas células, entretanto esse mecanismo ainda não está esclarecido (MATWEE et al., 2000; PARK et al., 2006).

Segundo SREEDHAR et al. (1999), existe uma relação das Hsp com a apoptose, porém não se sabe ao certo qual seria o mecanismo em que essas

proteínas atuam, com a conseqüente inibição da morte celular programada. Alguns pesquisadores têm demonstrado que a citoproteção induzida pelas Hsp pode também ser atribuída parcialmente à supressão da apoptose, embora o preciso mecanismo desse efeito ainda não esteja elucidado (SAMALI & ORRENIUS, 1998). Uma evidência adicional que confirma a relação entre a citoproteção e a resistência a apoptose é o fato de que células que apresentam falhas ao responder ao estresse são sensíveis à morte celular via apoptose (SREEDHAR et al., 1999). Estudos indicam que as Hsp70 e 90 atuam em alguns pontos chave na cascata da apoptose como a inibição da formação do complexo “apoptosome” ao impedir a ligação da procaspase 9 à molécula de APAF 1 (apoptotic protease activating factor 1) (BEERE et al., 2000), a redução do processamento da procaspase 3 e o aumento de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 (MOSSER et al., 1997).

#### **2.4.2 Expressão gênica**

O termo expressão gênica refere-se ao processo pelo qual a informação genética contida num gene específico é traduzida em uma proteína específica que exercerá sua função na célula ou fora dela (WILHELM, 2003). Este processo ocorre através de uma cascata de eventos, regulados por ligações de proteínas a uma seqüência regulatória de DNA, que ativam sinais bioquímicos em cadeia, resultando na ativação ou repressão de diversos genes.

Aproximadamente 10.000 genes precisam ser expressos para que se tenha uma orquestrada regulação do desenvolvimento embrionário pré e pós-implantacional (MOHAN et al. 2002). Entretanto, até o momento, apenas 15

funções fisiológicas e a expressão de 60 a 70 genes foram bem estudados (TESFAYE et al., 2003).

Os genes expressos podem ser constitutivos ou induzidos. Os constitutivos são expressos em todas as células e responsáveis por funções comuns e os induzidos àqueles responsáveis por funções específicas, sendo expressos a partir de um determinado estímulo (RAMALHO, 2000). Durante o período pré-implantacional, o embrião passa por uma série de eventos de desenvolvimento morfo-genéticos incluindo desde a maturação do oócito, à ativação do genoma embrionário, quando ocorre a transição do controle de transcrição de materno para fetal. O efeito de alterações no padrão de expressão gênica em embriões produzidos *in vitro*, principalmente quando cultivados em condições subótimas pode ser alterada em resposta ao estresse ambiental, o que provavelmente é uma maneira de estabilizar sua função celular. Assim, a aplicação de ferramentas moleculares para avaliar embriões em estádios pré-implantacionais nos animais de produção podem trazer novos conhecimentos sobre o desenvolvimento de embriões mamíferos, ajudando a incrementar os procedimentos de biotecnologia (KANKA et al., 2003).

#### **2.4.3 PCR quantitativo em tempo real**

Estudos de expressão gênica vêm sendo empregados em vários organismos como humanos, camundongos, suínos, bovinos e outras espécies. A maioria dos estudos tem a finalidade de identificar e caracterizar genes relacionados a características economicamente importantes, como no caso das reprodutivas e aquelas relacionadas à resistência de doenças, sendo esta

importante ferramenta para a seleção e avaliação de genes candidatos (FAHRENKRUG et al., 2002).

Dentre as metodologias disponíveis para a identificação e a expressão de determinados genes, encontra-se a análise genômica funcional, que possibilita caracterizar os padrões de expressão mRNA e proteína. O produto inicial da expressão gênica em um organismo é denominado transcriptoma e refere-se ao conjunto de mRNA, cuja informação é requerida pela célula em determinado momento (BINNECK, 2004). Portanto, a quantidade de mRNA indica a expressão de determinado gene (HOCQUETTE, 2005).

A Transcrição Reversa combinada à reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR) é um método *in vitro* para amplificar seqüências definidas de mRNA, sendo utilizada especialmente em situações em que somente pequenas quantidades de material são disponíveis para a análise. Pode ser utilizado para determinar a presença ou ausência de determinado transcrito, comparar níveis de mRNAs em diferentes amostras e para caracterizar padrões de expressão de mRNAs. A PCR convencional não pode ser usada em estudos que visam quantificar ou mesmo medir diferenças de níveis de expressão de diferentes amostras, pois, ao contrário da PCR convencional, o método de qPCR monitora a reação em cada ciclo, permitindo a detecção direta dos produtos de PCR na fase exponencial da reação, onde a quantidade de fragmento gerado é proporcional à quantidade inicial. Este método é muito sensível e pode ser usado para quantificar mRNA em baixos níveis, assim, ele tem se mostrado uma poderosa ferramenta na quantificação da expressão gênica (WONG & MEDRANO, 2005).

### 3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F.A.P.; DUARTE, M.V. Transferência de embriões Nelore congelados. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.24, n.1, p.252, 1996. Suplemento.

AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. **Reproduction in Mammals**, CAB International, 2. Cambridge, UK: University Press, 1982, 190p.

AZEVEDO, N.A.; COELHO, E.N.; REFHELD, O.A.M.; CHOW, L.A.C. Eficiência da avaliação ginecológica prévia com o emprego do vaginoscópio em receptoras sobre o índice de prenhez de embriões de doadoras *Bos taurus taurus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, X., 1993. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 1993, v.II, p.483-493.

BAGUISI, A.; ARAV, A.; CROSBY, T.F.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M.P. Hypothermic storage of sheep embryos with freeze proteins development *in vitro* e *in vivo*. **Theriogenology**, v.48, n.6, p.1017-1024, 1997.

BAVISTER, B.D. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. **Theriogenology**, v.29, n.1, p.143-54, 1988.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, n.2, p.91-148, 1995.

BECKER, J.; CRAIG, E.A. Heat-shock proteins as molecular chaperones. **European Journal Biochemistry**, v.219, p.11-23, 1994.

BEERE, H.M.; WOLF, B.B.; CAIN, K.; et al. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase 9 to the Apaf-1 apoptosome. **Nature Cell Biology**, v.2, p.469-475, 2000.

BETTS, D.; KING, W.A. Genetic regulation of the embryo death and senescence. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.171-191, 2001.

BINNECK, E. As ômicas: integrando a bioinformação. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.32, p.28-37, 2004.

BORGES, A.C.M.; COELHO, E.N.; AZEVEDO, N.A.; CHOW, L.A. Desempenho reprodutivo de vacas brucélicas e não brucélicas em um programa de transferência de embriões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, X., 1993. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 1993, v.II, p.483-493.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v.39, p.615-647, 2003.

BRAUDE, P.; BOLTON, V.; MOORE, S. Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development. **Nature** v.332, p.459-461, 1988.

BRISON, D.R.; SCHULTZ, R.M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1088-1096, 1997.

BUTCHER, L.; COATES, A.; MARTIN, K.L.; RUTHERFORD, A.J.; LEESE, H.J. Metabolism of pyruvate by the early human embryo. **Biology of Reproduction**, v.58, n.4, p.1054-1056, 1998.

BYRNE A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON DR.; LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.117, p.97-105, 1999.

CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L. McKINNON, A.O. Comparison of Ham's F10 with CO<sub>2</sub> or hepes buffer for storage of equine embryos at 5°C for 24h. **Journal of Animal Science**, v.65, n.6, p.1775-1781, 1987.

CARNEY, N.J.; SQUIRES E.L.; COOK, V.M.; SEIDEL Jr.G.E.; JASKO, D.J. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. **Theriogenology**, v.36, n.1, p.23-32, 1991.

CAVALCANTI NETO, C.C. **Uso do retinol na produção *in vitro* de embriões caprinos**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2004. 98p. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2004.

CHANG, H.Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiology Molecular Biology Review**, v.64, n.4, p.821-846, 2000.

CHUNG, S.O. Volume changes during the preimplantation stages of mouse egg development. **Yonsei Medical Journal**. v.14, p.63-90, 1973.

COUTINHO, A.R.S. **Presença da caspase-3 ativa e das proteínas de reparo de lesões do DNA em embriões suínos ativados partenogeneticamente com alta ou baixa capacidade de desenvolvimento**. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. 114p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007.

DIDENKO, V.V.; HORNSBY, P.J. Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. **Journal of Cell Biology**, v.135, p.1369-1376, 1996.

DIX, D.J.; GARGES, J.B.; HONG, R.L. Inhibition of hsp70-1 and hsp70-3 expression disrupts preimplantation embryogenesis and heightens embryo sensitivity to arsenic. **Molecular Reproduction and Development**, n.51, p.373-380, 1998.

DONNAY, I.; LEESE, H.J. Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, n.2, p.171-178, 1999.

DORLAND, M.; KRUIP, T.A.M.; VAN DER DONK, J.A. Assessing day 7 bovine embryo viability by measuring the rate of nutrient uptake. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.9, n.27, p.40, 1992.

DOWNS, S.M.; MASTROPOLO, A.M. Culture conditions affect meiotic regulation in *cumulus* cell – enclosed mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, n.4, p.551-556, 1997.

ESSIG, D.A.; NOSEK, T.M. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.22, n.5, p.409-428, 1997.

FAHRENKRUG, S.C.; SMITH, T.P.I.; FREKING, B.A.; CHO, J.; WHITE, J.; VALLET, J.; WISE, T.; ROHER, G.; PERTEA, G.; SULTANA, R.; QUACHENBUSH, J.; KEELE, J.W. Porcine gene discovery normalized cDNA-library sequencing and EST cluster assembly. **Mammalian Genome**, v.13, p.475-478, 2002.

FEHRENBACH, E.; NIESS, A. Role of heat shock protein in the exercise response. **Exercise Immunology Review**, v.5, p.57-77, 1999.

FEIGE, U.; POLLA, B.S. Hsp70 – a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. **Experientia**, v.50, p.979-986, 1994.

FLACH, G.; JOHNSON, M.H. BRAUDE, P.R.; TAYLOR, R.A.; BOLTON, V.N. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. **EMBO Journal**, v.1, p.681-686, 1982.

FONSECA, J.F.; SILVA FILHO, J.M.; PINTO NETO, A.; PALHARES, M.S. Estádios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.6, p.671-676, 2001.

FREITAS, C.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; JUNQUEIRA, M.M. Desempenho de vacas Gir na resposta superovulatória e produção de embriões. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.25, n.1, p.232-233, 1997. Suplemento.

FULLER, K.J.; ISSELS, R.D.; SLOSMAN, D.O.; GUILLET, J.G.; SOUSSI, T.; POLLA, B.S. Cancer and the heat shock response. **European Journal Cancer**, v.30, n.1, p.884-891, 1994.

GARBUTT, C.L.; JOHSON, M.H. GEORGE, M.A. When and how does cell division order influence cell allocation to the inner cell mass of the mouse blastocyst? **Development**, v.100, n.2, p.325-332, 1987.

GARDNER, D.K.; LEESE, H.J. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. **Journal Reproduction and Fertility Development**, v.88, n.1, p.361-368, 1990.

GARDNER, D.K.; LEESE, H.J. Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation mouse embryos. **Human Reproduction**, v.1, n.1, p. 25-27, 1986.

GASQUES, J.G.; BASTOS, E.T.; CONTINI, E.; SAAB, A.A.; SILVA, L.F. Projeções do Agronegócio no Brasil 2006/07 a 2016/17. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, XLV., 2007. Londrina. **Anais...** Londrina, 2007. 21p.

GJORRET, J.O.; KNIJN, H.M.; DIELEMAN, S.J.; AVERY, B.; LARSSON, L.I.; MADDOX-HYTTLE, P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1193-1200, 2003.

GOMES, H.F. **Destino da glicose e identificação da enzima GSK-3 em ovidutos de vacas zebuínas**. Campos de Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006. 67p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. CAB International, n.11. Cambridge, UK: University Press, 1994. 640p.

GOTTLIEB, R.A. Role of mitochondria in apoptosis. **Critical Reviews. Eukaryotic Gene Expression**, n.10, p.231-239, 2000.

GREEN, D.R.; EVAN, G.I. A matter of life and death. **Cancer Cell**, v.1, n.1, p.19-30, 2002.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-342, 2007.

HANDYSIDE, A.H.; HUNTER, S. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. **Development Genes and Evolution**, v.195, p.519-526, 1986.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.919-925, 1997.

- HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. **Reproduction**, v.4, p.125-134, 1999.
- HARDY, K.; SPANOS, S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. **Journal Endocrinology**, v.172, p.221-236, 2002.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770-776, 2002.
- HERRLER, A.; KRUSCHE, C.A.; BEIER, H.M. Insulin and insulin-like growth factor I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1302–1310, 1998.
- HOCQUETTE, J.F. Where are we in genomics? **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.56, n.3, p.37-70, 2005.
- HOUGHTON, F.D.; LEESE, H.J. Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.115, p.S92- S96, 2004.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.
- ISRAELS, L.G.; ISRAELS, E.D. Apoptosis. **Stem Cells**, n.17, p.306-313, 1999.
- IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; PARAMIO, M. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. **Theriogenology**, v.52, n.5, p.847-861, 1999.
- JACOBSON, M.D.; WEIL, M.; RAFF, M.C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v.88, p.347-354, 1997.
- JEONG, Y.J.; CUI, X.S.; KIM, B.K.; KIM, I.H.; KIM, T.; CHUNG, Y.B.; KIM, N.H.; Haploidy influences Bak and Bcl-xL mRNA expression and increases incidence of apoptosis in porcine embryos. **Zygote**, v.13, n.1, p.17-21, 2005.
- JURISICOVA, A. VARMUZA, S.; CASPER, R.F. Involvement of programmed cell death in preimplantation embryo demise. **Human Reproduction Update**, v.1, n.6, p.558-566, 1995.
- KANKA, J.; BRYOVA, A.; DURANTHON, V.; OUDIN, J.F.; PEYNOT, N.; RENARD, J.P. Identification of differentially expressed mRNA in bovine preimplantation embryos. **Zygote**, v.11, n.1, p.43-52, 2003.
- KAPLOWITZ, N. Cell death at the millennium. Implications for liver diseases. **Clinics Liver Disease**, v.4, p.1-23, 2000.

KERR, J.F.; SEARLE, J. The digestion of cellular fragments within phagolysosomes in carcinoma cells. **Journal of Pathology**, v.108, p.55-58, 1972.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. **Theriogenology**, v.54, n.2, p.313-326, 2000.

KIM, J.H.; NIWA, K.; LIM, J.M.; OKUDA, K. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in vitro*-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. **Biology of Reproduction**, v.48, n.6, p.1320-1325, 1993.

KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRAN, E.C.; VAN DERWEIJDEN, G.C.; NIEMANN, H.; DIELEMAN, S.J. *In vitro* and *in vivo* culture effects on mRNA expression of genes involved in metabolism and apoptosis in bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, p.775-784, 2005.

LEE, C.S.; KOO, D.B.; FANG, N.; LEE, Y.; SHIN, S.T.; PARK, C.S.; LEE, K.K. Potent and stage-specific action of glutathione on the development of goat early embryos *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.57, n.1, p.48-54, 2000.

LENZ, R.W.; BALL, G.D.; LEIBFRIED, M.L.; AX, R.L.; FIRST, L.A. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent process. **Biology of Reproduction**, v.29, p.173-179, 1983.

LEVY, R.R.; CORDONIER H.; CZYBA, J.C.; GUERIN, J.F. Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v.106, p.101-108, 2001.

LEWIS, W.H.; WRIGHT, E.S. On the early development of the mouse egg. **Contributions to Embryology Carnegie Institution of Washington**, n.25, p.115-144, 1935.

LIM, J.M.; HANSEL, W. Exogenous substances affecting development of *in vitro* – derived bovine embryos before and after embryonic genome activation. **Theriogenology**, v.53, n.5, p.1081-1091, 2000.

LINARES, T.; KING, M.A. Morphological study of the bovine blastocyst with phase contrast microscopy. **Theriogenology**, v.14, n.2, p.123-133, 1980.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat shock proteins. **Annual Reviews Genetics**, v.22, p.631-677, 1998.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MOREIRA, P.M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the

zygote to blastocyst stage *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1424-1431, 2003.

LOTTERMANN, A.; RANZOLIN, A.; VON MÜHLEN, C.A; STAUB, H.L. Anticorpos contra proteínas de choque térmico, autoimunidade e aterosclerose. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.43, n.5, p.302-308, 2003.

MARTIN, K.L.; LEESE, H.J. Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v.40, n.4, p.436-443, 1995.

MASSIP, A.; ZWIJSEN, W.; MULNARD, J. Cinematographic analysis of the cleavage of the cow egg from 2-cell to 16-cell stage. **Archive of Biology**, v.94, p.99-106, 1983.

MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Developmental regulation of apoptosis in the early bovine embryo. **Theriogenology**, v.51, p.185, 1999.

MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v.8, p.57-68, 2000.

MEHTA, T.S.; KIESSLING, A.A. Development potential of mouse embryos conceived *in vitro* and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. **Biology of Reproduction**, v.43, n.4, p.600-606, 1990.

MELO, P.S.; SILVYA, S.M., VIDAL, B.C.; HAUN, M.; DURAN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cellular e Developmental Biology-Animal**, n.36, p.539-543, 2000.

MÉNÉZO, Y.J.R.; HAMAMAH, A.H.; DALE, B. Time to switch from co-culture to sequential defined media for transfer at the blastocyst stage. **Human Reproduction**, v.13, n.8, p.2043-2044, 1998.

MEYER, T.N.; DA SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.45, n.2, p.181-188, 1999.

MINGOTI, G.Z. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese: papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides**. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2000. 141p. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2000.

MINOWADA, G.; WELCH, W.I. Clinical implications of the stress response. **Journal of Clinical Investigation**, v.95, p.03-12, 1995.

MOHAN, M.; RYDER, S.; CLAYPOOL, P.L.; GEISERT, R.D.; MALAYER, J.R. Analysis of gene expression in the bovine blastocyst produced *in vitro* using

suppression-subtractive hybridization. **Biology of Reproduction**, v.67, n.2, p.447-453, 2002.

MOLINA, L.R.; SATURNINO, H.M. Avaliação do método "one-step" na criopreservação de embriões bovinos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.17, n.3-4, p.89-96, 1993.

MÖLLER, G. Heat shock proteins and the immune system. **Immunological Reviews**, v.121, p.1-220, 1991.

MORALES, H.; TILQUIN, P.; REES, J.F.; MASSIP, A.; DESSY, F.; VAN LANGENDONCKT, A. Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.52, n.2, p.149-157, 1999.

MORIMOTO, R.I. Regulation of the heat shock transcription response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes Development**, v.12, p.3788-3796, 1998.

MOSSER, D.D.; CARON, A.W.; BOURGET, L.; DENIS-LAROSE, C.; MASSIE, B. Role of the human heat shock protein 70 in protection against stress induced apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v.17, n.9, p.5317-5327, 1997.

MURPHY, B.M.; MARTIN, S.J. Caspases. In: MING, X.; DONG, Z. **Essential of apoptosis: a guide for basic and clinical research**. Totowa: Human Press Inc., cap.1, p.03-12, 2003.

NASSER, L.F.T. **Resposta superovulatória na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore (Bos indicus)**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2006. 79p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2006.

NEUER, A.; SPANDORFER, S.D.; GIRALDO, P.; JEREMIAS, J.; DIETERLE, S.; KORNEEVA, I.; LIU, H.C.; ROSENWAKS, Z.; WITKIN, S.S. Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v.7, n.1-2, p.10-16, 1999.

NICHOLSON, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death Differentiation**, v.6, p.1028-1042, 1999.  
O'FARRELL, P.H.; STUMPFF, J.; SU, T.T. Embryonic cleavage cycles: how is a mouse like a fly? **Current Biology**, v.14, p.R35-R45.

O'NEIL, C. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos in vitro. **Biology of Reproduction**, v.58, p.1303-1309, 1998.

PANDEY, P. SALEH, A.; NAKAZAWA, A.; KUMAR, S.; SRINIVASA, M.; KUMAR, S.V.; WEICHSELBAUM, R.; NALIN, C.; ALNEMRI, E.S.; KUFE, D.;

KHARBANDA, S. Negative regulation of cytochrome c – mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase - 9 by heat shock protein 90. **EMBO Journal**, v.19, n.16, p.4310-4322, 2000.

PARK, S.Y.; KIM, E.Y.; CUI, X.S.; TAE, J.C.; LEE, W.D.; KIM, N.H.; PARK, S.P.; LIM, J.H. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. **Zygote**, v.14, p.125-131, 2006.

PAROLIN, M.B.; REASON, I.J.M. Messias. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivo de Gastroenterologia**, v.38, n.2, p.138-144, 2001.

PARTRIDGE, R.J.; LEESE, H.J. Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, n.6, p.945-950, 1996.

PAULA-LOPES F.F.; HANSEN P.J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.295, n.1, p.37-42, 2002.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. Belo Horizonte: FEP-MVZ Editora, 1999. 493p.

PEDERSEN, M.E.; OZDAS, O.B.; FARSTAD, W.; TVERDAL, A.; OLSAKER, I. Effects of bovine oviduct epithelial cells, fetal calf serum and bovine serum albumin on gene expression in single bovine embryos produced in the synthetic oviduct fluid culture system. **Reproduction Fertility and Development**, v.17, n.8, p.751-757, 2005.

PEREZ, G.I.; ACTON, B.M.; JURISICOVA, A.; PERKINS, G.A.; WHITE, A.; BROWN, J.; TRBOVICH, A.M.; KIM, M.R.; FISSORE, R.; XU, J.; AHMADY, A.; D'ESTAING, S.G.; LI, H.; KAGAWA, W.; KURUMIZAKA H., YOKOYAMA, S. OKADA, H.; MAK, T.W.; ELLISMAN, M.H.; CASPER, R.F. TILLY, J.L. Genetic variance modifies apoptosis susceptibility in mature oocytes via alterations in DNA repair capacity and mitochondrial ultrastructure. **Cell Death Differentiation**, v.14, n.3, p.524-533, 2007.

PESSAYRE, D.; HAOUZI, D.; FAU, D.; ROBIN, M.A.; MANSOURI, A.; BERSON, A. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. **Journal Hepatology**, v.31, p.760-770, 1999.

PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. **Theriogenology**, v.41, n.6, p.1241-1249, 1994.

PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; OBBERDANER, C.B.; KRAMMER, B. Apoptosis following photodynamic tumor therapy: induction, mechanisms and detection. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, p.1151-1165, 2005.

PONSUKSILI, S.; TESFAYE, D.; EL-HALAWANY, N.; SCHELLANDER, K.; WIMMERS, K. Stage-specific expressed sequence tags obtained during preimplantation bovine development by differential display RT-PCR and suppression subtractive hybridization. **Prenatal Diagnosis**, v.22, n.12, p.1135-1142, 2002.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. Regulação da expressão gênica. In: **Genética na Agropecuária**, 2ªed., Editora UFLA, 472p. 2000.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS-FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: Gonsalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1ªed. São Paulo: Editora Varela, 2002. p.127-177.

RIEGER, D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenology**, v.37, n.1, p.75-93, 1992.

RILEY, J.K.; MOLEY, K.H. Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. **Reproduction**, v.131, n.5, p.823-835, 2006.

RITOSSA, F.M. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.18, n.12, p.571-573, 1962.

RIVERA, R.M.; DAHLGREN, G.M.; CASTRO E PAULA, L.A.; KENNEDY, R.T.; HANSEN, P.J. Actions of thermal stress in two-cell bovine embryos: oxygen metabolism, glutathione and ATP content, and the time-course of development. **Reproduction**, v.128, n.1, p. 33-42, 2004.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v.68, p.236-243, 2003.

ROSENKRANS, C.F.Jr.; ZENG, G.Q.; McNAMARA, G.T.; SCHOFF, P.K.; FIRST, N.L.. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. **Biology of Reproduction**, v. 49, n.3, p.459-462, 1993.

ROSENKRANS, C.F.; FIRST, N.L. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and development rate of bovine zygotes *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.72, n.2, p.434-437, 1994.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genomics and apoptotic events. **Biological Chemistry**, v.385, p.449-464, 2004.

SALEH, A.; SRINIVASULA, S.M.; BALKIR, L.; ROBBINS, P.D.; ALNEMRI, E.S. Negative regulation of the Apaf - 1 apoptosome by Hsp70. **Nature Cell Biology**, v.2, p.476-483, 2000.

SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. **Cell Stress Chaperones**, v.3, p.228-236, 1998.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v.45, n.3, p.528-537, 2000.

SCHARF, K.D.; HÖHFELD, I.; NOVER, L. Heat stress response and heat stress transcription factors. **Journal Bioscience**, v.23, 313-329, 1998.

SCHIEWE, M.C.; SCHMIDT, P.M.; BUSCH, M.; WILDT, D.E. Toxicity potential of absorbed/retained ethylene oxide residues in culture dishes on embryo development in vitro. **Journal of Animal Science**, v.60, n.6, p.1610-1618, 1985.

SCHULTZ, L.B.; CHEHAB, N.H.; MALIKZAY, A.; HALAZONETIS, T.D. P53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. **The Journal of Cell Biology**, v.151, n.7, p.1381-1390, 2000.

SENGER, P.L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. Current Conceptions, Inc. n.2, p. 284-296, 2003.

SMITH, R.; McLAREN, A. Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele. **Journal Embryology Experimental Morphology**, 41, p.79-92, 1977.

SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (IETS). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 2ªed. Champaign, Illinois: International Embryo Transfer Society, 1990. 89p.

SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (IETS). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3ªed. Champaign, Illinois: International Embryo Transfer Society, 1998. 180p.

SPANOS, S.; RICE, S.; KARAGIANNIS, P.; TAYLOR, D.; BECKER D.L.; WINSTON, R.M. Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. **Reproduction**, v.124, p.353-363, 2002.

SQUIRES, E.; McCUE, P.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.51, n.1, p.91-104, 1999.

SREEDHAR, A.S.; PARDHASARADHI, B.V.; BEGUM, Z.; KHAR, A.; SRINIVAS, K.U. Lack of heat shock response triggers programmed cell death in a rat histiocytic cell line. **FEBS Letters**, v.456, p.339-342, 1999.

SUWINSKA, A.; CZOŁOWSKA, R.; OZDZENSKI, W.; TARKOWSKI, K. Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. **Developmental Biology**, v.322, p.133-144, 2008.

TAKAYAMA, S.; REED, J.C.; HOMMA, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. **Oncogene**, v. 22, p. 9041–9047, 2003.

TAYLOR, W.G. Toxicity and hazards to successful culture: cellular response to damage induced by light, oxygen or heavy metals. In: Patterson Jr., M.K. **Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures**. In Vitro Monograph, n.5. Gaithersburg, MD: Tissue Culture Association, 1984. p.58-70.

TELFORD, N.A.; WATSON, A.J; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, v.26, p.90-100, 1990.

TESFAYE, D.; PONSUKSILI, S.; WIMMERS, K.; GILLES, M.; SCHELLANDER, K. Identification and quantification of differentially expressed transcripts in vitro-produced bovine preimplantation stage embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.66, n.2, p.105-114, 2003.

THOMPSON, J.G.; PARTRIDGE, R.J.; HOUGHTON, F.D; COX, C.I; LEESE, H.J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, n.2, p.299-306, 1996.

THOMPSON, C.B. Apoptosis. In PAUL, W.E. (Ed.). **Fundamental immunology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, p.813-829, 1999.

THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, n.2, p.263-275, 2000.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Effect of pH of culture medium on *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**, v.47, n., p.286, 1997.

VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; SCHUURBIERS, N.; AUQUIER, P.; CAROLAN, C.; MASSIP, A.; DESSY, F. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, n.1, p.87-93, 1997.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in *in vitro* produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.47, p.47-56, 1997.

- VAN WINKLE, L.J.; HAGHIGHAT, N.; CAMPIONE, A.L. Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the inorganic ions in oviductal fluid. **Journal of the Experimental Zoology**, v.253, n.2, p.215-219, 1990.
- VANROOSE, G.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. From co-culture to defined medium: State of the art and practical considerations. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36, n.1, p.25-28, 2001.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, n.3, p.915-924, 2007.
- VIERLING, E. The role of heat shock proteins in plants. **Annual Reviews Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.42, p.579-620, 1991.
- WANG, W.H.; DAY, B.N. Development of porcine embryos produced by IVM/IVF in a medium with or without protein supplementation: effects of extracellular glutathione. **Zygote**, v.10, n.2, p.109-115, 2002.
- WATSON, A.J.; BARCROFT, L.C. Regulation of blastocyst formation. **Frontiers in Bioscience**, v.6, p.708–730, 2001.
- WATSON, A.J.; NATALE, D.R.; BARCROFT, L.C. Molecular regulation of blastocyst formation. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.583-592, 2004.
- WEIL, M.; JACOBSON, M.D.; COLES, H.S.; DAVIES, T.J.; GARDNER, R.L.; RAFF, K.D.; RAFF, M.C. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. **The Journal of Cell Biology**, v.1333, p.1053-1059, 1996.
- WELCH, W.J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/ function of stress proteins and implications for medicine and disease. **Physiological reviews**, v.72, p.1063-1081, 1992.
- WHITTEN, K.; DAGG, C.P. Influence of spermatozoa on the cleavage rate of mouse eggs. **Journal of Experimental Zoologie**, n148, p.173-183, 1961.
- WHITTINGHAM D.G.; BIGGERS, J.D. Fallopian tube and early cleavage in the mouse. **Nature**, v.213, p.942-943, 1967.
- WHITTINGHAM, D.G. Culture of mouse ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.48, Suppl.14, p.7-21, 1971.
- WHITTINGHAM D.G. Embryo banks in the future of developmental genetics. **Genetics**, v.78, n.1, p.395-342, 1974.
- WILHELM, J.; PINGOUD, A. Real-time polymerase chain reaction. **Chemistry and Biochemistry**, v.4, n.11, p.1120-1128, 2003.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v.39, n.1, p.75-85, 2005.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSawe, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reproduction Fertility and Development**, v.17, n.1-2, p.23-35, 2005.

## CAPÍTULO 1

### **Desenvolvimento de embriões de camundongas após manutenção em diferentes meios de manipulação**

*Development of mice embryos after maintenance in different manipulation medias*

Flávio Guiselli Lopes<sup>1</sup>; Eduardo Paulino da Costa<sup>2</sup>; Emílio César Martins Pereira<sup>3</sup>; Tarcízio Antônio Rêgo de Paula<sup>4</sup>; Rafael José Otero Arroyo<sup>1</sup>; Carlos Antônio de Carvalho Fernandes<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Doutorandos - DVT - UFV

<sup>2</sup> Professor Associado - DVT - Universidade Federal de Viçosa. [epcosta@ufv.br](mailto:epcosta@ufv.br)

<sup>3</sup> Mestrando - DVT - UFV

<sup>4</sup> Professor Associado - DVT - UFV

<sup>5</sup> Biotran – Biotecnologia e Treinamento em Reprodução Animal

**Resumo** - O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de dois meios de manipulação de embriões. Foram utilizados embriões de camundongas nos estádios de blastocisto inicial (Bin), mórula compacta grau I (Mcl) e II (McII), distribuídos aleatoriamente em três tratamentos, de acordo com o meio de manutenção: T1 – PBS modificado (Controle); T2 (MD1) e T3 (MD2). Os embriões foram mantidos durante quatro horas no meio de manutenção e posteriormente classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e quanto à qualidade embrionária. Logo após, foram cultivados em meio TCM 199 e classificados novamente quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade

embrionária. A taxa de desenvolvimento dos embriões após manutenção por quatro horas no meio de manipulação foi inferior ( $P < 0,05$ ) para os embriões do Controle, quando comparada com os embriões do MD1 e MD2, diferença esta não observada ( $P > 0,05$ ) após o cultivo *in vitro*. Contudo, os embriões McII do T3 tiveram um maior desenvolvimento ( $P < 0,05$ ), quando comparado com embriões do T1 e T2, indicando o efeito benéfico do enriquecimento do meio MD2. Conclui-se que os meios de manipulação MD1 e MD2 influenciaram benéficamente no desenvolvimento de embriões, apresentando superioridade, quando comparado a solução PBS modificada.

Palavras-Chave: Camundonga, embrião, reprodução

**Abstract** - This work studied the effects of different manipulation medias followed by *in vitro* culture in mice embryos. The embryos used in the experiment were all at early blastocyst (Bin), compact morula grade I (MCI) and II (McII), randomly assigned in three treatments: T1 – modified PBS (Control); T2 (MD1) and T3 (MD2). In each treatment the embryos were kept in manipulation media for four hours. Finishing the manipulation period, the embryos were classified according the development stage and quality. Following, embryos were cultured in TCM 199. After the culture period, the embryos were being evaluated accordingly quality and development stage. The development rate for Bin, MCI and McII after maintenance for four hours in manipulation media between was lower for Control ( $P > 0.05$ ) when compared with MD1 and MD2. However, after *in vitro* culture, was not observed difference ( $P > 0.05$ ) on embryo development rate among Control, MD1 and MD2. Moreover, McII from MD2 had a higher development ( $P < 0.05$ ) (93%), when compared with Control (82.5%) and MD1 (83.9%), indication a beneficial effect when MD2 is supplemented. In brief, the manipulations media MD1 and MD2 had a positive effect on embryo development, suggesting being better than modified PBS solution.

**Keywords:** mouse, embryo, reproduction

## Introdução

O estudo básico da morfologia do desenvolvimento embrionário de mamíferos, especialmente de camundongos e de bovinos teve início a partir da década de 40. Nas espécies mamíferas, muitos eventos importantes ocorrem durante o desenvolvimento embrionário, desde a fase de zigoto até a formação do blastocisto. Isto inclui a primeira clivagem; a ativação do genoma embrionário, no estágio de duas células para camundongos (Whittingham e Biggers, 1967; Bavister, 1988) e 8-16 células para bovinos (Kanka et al., 2003); a compactação da mórula e a formação do blastocisto, que estabelece a diferenciação de dois tipos celulares, trofoblasto (TF) e massa celular interna (MCI). O TF é composto por células externas do blastocisto que originam as membranas extra-embrionárias, enquanto que as células da MCI originam o feto e contribuem em parte, para a formação das membranas extra-embrionárias (Lonergan et al., 2003).

De acordo com Van Soom et al. (1997); Rizos et al. (2003), a cinética do desenvolvimento embrionário depende do sucesso em controlar os momentos temporal e espacial da expressão após a ativação do genoma embrionário, ou seja, qualquer modificação nas condições de cultivo pode afetar um ou todos estes processos, tendo efeito sobre a qualidade e, conseqüentemente a viabilidade embrionária. Este critério, por sua vez, envolve aspectos relacionados à velocidade de determinados processos morfológicos, tais como a duração mais curta ou mais longa do processo de compactação de mórulas, expansão mais lenta ou mais rápida da blastocela e diferenças no momento da eclosão (Gonzales e Bavister, 1995).

A manutenção do embrião em uma solução adequada, desde a coleta até a inovulação é um aspecto importante, uma vez que pode interferir na qualidade e, conseqüentemente, na viabilidade embrionária (Bavister, 1995). De acordo com Vanroose et al. (2001), a escolha de meios e substratos energéticos têm impacto importante sobre o desenvolvimento e a viabilidade de embriões.

Atualmente, a solução de manipulação empregada nas rotinas de TE em bovinos têm sido o PBS modificado (Whittingham, 1971). A solução fosfatada tamponada (PBS) foi formulada por Dulbecco & Vogt em 1954 para uso em

manipulação de cultivos bacterianos e, posteriormente, modificada por Whittingham em 1971, para a manipulação de embriões de camundongas. Com o sucesso obtido pelo pesquisador, poucos estudos foram realizados no intuito de encontrar soluções mais apropriadas e estáveis para a manipulação de embriões nas diferentes espécies animais.

O PBS modificado (Whittingham, 1971) está sujeito a eventuais mudanças na composição, como variações de pH, quando armazenado por longo período de tempo em temperatura e à luz ambiente (Gordon, 1994). Portanto, a solução deve ser armazenada em local com pouca luminosidade, em ambiente refrigerado (temperatura mínima de 4°C).

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos de diferentes meios de manipulação e posterior cultivo *in vitro* de embriões de camundongas, avaliando o subsequente desenvolvimento embrionário.

### **Material e Métodos**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal – DVT/UFV, utilizando embriões de camundongas da espécie *Mus musculus*, da linhagem Suíça-Albina. O protocolo de superovulação e coleta de embriões foi realizado segundo Rafferty (1970). Os aspectos éticos foram rigidamente considerados, sendo o projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, processo 10/2006, em reunião realizada no dia 26 de abril de 2006.

Foram testados dois meios de manipulação utilizados para coleta e manipulação de embriões, MD1\* e MD2\* e como controle o PBS modificado (Whittingham, 1971), usualmente empregado nas rotinas de TE nas diferentes espécies animais. A composição do meio MD1 foi definida da seguinte maneira: Cloreto de Sódio (0,1027 mol L<sup>-1</sup>); Cloreto de Potássio (0,0040 mol L<sup>-1</sup>); Cloreto de Cálcio (0,0018 mol L<sup>-1</sup>); Lactato de Sódio (0,0277 mol L<sup>-1</sup>). O MD2 foi elaborado com a mesma formulação do MD1, acrescido de 0,0003 mol L<sup>-1</sup> de Piruvato de Sódio.

Os meios MD1 e MD2 foram produzidos e ajustados com glicose para 290 mOsm, com o auxílio de um osmômetro (Osmette A<sup>®</sup> Automatic

---

\* Patente solicitada

Osmometer) e o pH ajustado para 7,2 a 7,4. Todos os reagentes utilizados para a produção dos meios de manipulação e de cultivo foram testados para cultivo celular. Além disso, os antibióticos utilizados para os meios MD1 e MD2 foram os mesmos utilizados no PBS modificado (Whittingham, 1971).

Para o estudo, foram utilizados apenas embriões nos estádios de blastocisto inicial (Bin), mórula compacta grau I (Mcl) e II (McII), distribuídos aleatoriamente em três tratamentos: T1 – PBS modificado (Controle); T2 (MD1) e T3 (MD2).

Os embriões de cada tratamento foram mantidos em placas de quatro poços (Nunc® A/S), durante quatro horas, em meio de manipulação, previamente equilibrado (37°C) e acrescido de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA), fração V.

Após o término do tempo de manipulação, os embriões foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e quanto à qualidade embrionária (IETS, 1998), com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus Optical®, modelo SZ-40/ SZ-ST) em ocular de 10X e objetiva de 4X. Depois de classificados, os embriões foram transferidos e cultivados em placas de quatro poços (Nunc® A/S), durante 10 horas, em meio de cultivo TCM 199 modificado (Costa et al., 1997), previamente equilibrado (37°C), em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora (Jouan®, modelo IG 150).

Após o término do tempo de cultivo, os embriões foram transferidos e lavados em placa escavada, em meio Talp-Hepes modificado (Costa et al., 1997), previamente equilibrado (37°C), sendo classificados novamente quanto ao estágio de desenvolvimento e quanto à qualidade embrionária (IETS, 1998), com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus Optical®, modelo SZ-40/ SZ-ST) em ocular de 10X e objetiva de 4X.

As variáveis qualitativas foram comparadas em tabelas de contingência e analisadas pelo teste do qui-quadrado a 5% de probabilidade (Sampaio, 2002).

## **Resultados e Discussão**

No presente estudo, a taxa de desenvolvimento de embriões Bin, Mcl e McII após manutenção por quatro horas no meio de manipulação foi inferior ( $P < 0,05$ ) para o Controle, quando comparada com os embriões do MD1 e MD2. Estes resultados demonstram a superioridade dos meios propostos, em comparação com o PBS modificado (Whittingham, 1971) (Tab. 1, 2 e 3). Uma das prováveis explicações para essas diferenças pode estar relacionada a disponibilidade e às concentrações de substratos energéticos presentes nas soluções de manipulação (Rieger, 1992; Bavister, 1995; Donnay e Leese, 1999; Thompson, 2000).

De acordo com Vanroose et al. (2001), a escolha de meios e substratos energéticos têm impacto importante sobre o desenvolvimento e a viabilidade de embriões. Para Rizos et al. (2003) e Lonergan et al. (2003) o cultivo *in vitro* é considerado período crítico, pois pode alterar o padrão de expressão gênica e, assim, comprometer a qualidade e a sobrevivência após a transferência de embriões em estágio pré-implantacional. Corroborando com estes autores, Khurana e Niemann (2000), em seus estudos, verificou que alterações encontradas em embriões produzidos *in vitro* podem estar relacionadas principalmente às condições adversas de cultivo, às quais os embriões são expostos.

Ménézo et al. (1998), em seus primeiros trabalhos, verificaram que a utilização de um único meio de cultivo (co-cultura de células de tuba uterina e da granulosa), da fecundação até o estágio de blastocisto, resultou em baixa taxa de blastocistos (50%) e implantação de blastocistos transferidos (25%). Para Bavister (2000), este fato aponta para a inadequação do meio de cultivo em proporcionar o desenvolvimento normal aos estádios embrionários iniciais.

Os embriões podem secretar diversos compostos com concentrações variáveis, de acordo com suas especializações, nutrição ou tempo de manipulação. Segundo Donnay e Leese (1999) os substratos energéticos, como glicose, piruvato e lactato desempenham relevante papel no desenvolvimento embrionário e, por isso são utilizados nos diferentes meios de cultivo de embriões. Em alguns estudos, pesquisadores verificaram que o desenvolvimento embrionário é reduzido na ausência desses substratos (Kim et al., 1993; Rosenkrans et al., 1993).

A análise dos substratos energéticos de preferência embrionária realizada por Chatot et al. (1990); Gardner e Lane (1996); Quinn e Horstman (1998) e Lane e Gardner (2001), permitem a compreensão das interações entre os embriões e os componentes dos meios de cultivo e dos mecanismos reguladores e como eles podem ser perturbados *in vitro*. Segundo Bavister (2000), as condições de desenvolvimento *in vitro* ainda não substituem todos os benefícios do desenvolvimento no trato reprodutivo.

No presente estudo, os meios de manipulação foram constituídos de diferentes substratos energéticos como já descrito. Conforme elucidado por Bavister (1988); Gordon (1994) e Bavister (1995), essa interação de substratos pode ter sido responsável pelos resultados apresentados de desenvolvimento embrionário. No entanto, devido à escassez de literatura com relação a meios de manipulação e desenvolvimento embrionário de mamíferos, não foi possível comparar estes resultados com outros autores.

O embrião tem maior predileção ao piruvato e lactato nas fases iniciais de desenvolvimento embrionário, enquanto a glicose é incorporada nas fases finais de desenvolvimento (Bavister, 1995; Thompson, 2000). De acordo com Gardner e Leese (1986), o piruvato é utilizado pelos embriões ao longo de seu desenvolvimento, com um aumento de suas necessidades após a blastulação, sendo esse aumento essencial para a viabilidade do blastocisto (Dorland et al., 1992). Rieger (1992) e Martin e Leese (1995) mostraram que do piruvato captado pelo embrião, 44% são metabolizados no estágio de duas células e 17% pela mórula, quando a glicose passa a ser o substrato predominantemente utilizado, enquanto que em fases anteriores do desenvolvimento, o consumo de glicose é mínimo. O blastocisto utiliza apenas 29% do piruvato captado, enquanto nessa etapa, 44% da glicose captada é convertida em lactato (Gardner e Leese, 1990). A taxa entre piruvato e lactato é essencial para o balanço do potencial oxidação/ redução (Morales et al., 1999).

A glicose, por sua vez, contribui com apenas 17% da produção de ATP produzido pelo embrião, enquanto a oxidação do piruvato é responsável por 40% do ATP produzido (Houghton e Leese, 2004). A captação e utilização de glicose é vital para a sobrevivência e desenvolvimento do embrião durante o período de pré-implantação. Esse período se estende desde a fertilização até o

estádio de blastocisto, sendo que o decréscimo na captação de glicose durante esse estágio pode comprometer o desenvolvimento embrionário (Riley e Moley, 2006).

Segundo Bavister (1995), a síntese de lactato é detectada desde o estágio de uma célula até blastocisto, sugerindo que o embrião possui, desde o estágio inicial, a maquinaria completa de enzimas glicolíticas. O metabolismo de glicose em fases embrionárias iniciais está relacionado à síntese de uma ou mais enzimas glicolíticas pelo genoma do embrião, que é ativado na fase de blastocisto. A glicólise é funcional na fase de blastocisto quando há uma demanda de energia necessária para a compactação, expansão e formação de blastocelo. A utilização dessa via de produção de energia pelo embrião pode ser um reflexo de estresse metabólico ou de longo tempo submetido a condições subótimas (Khurana e Niemann, 2000).

Tabela 1. Taxa de desenvolvimento de embriões Bin após manutenção em meios de manipulação por quatro horas, nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Total de embriões	Desenvolvimento embrionário	
		N	%
Controle	153	66	43,1 <sup>a</sup>
MD1	183	125	68,3 <sup>b</sup>
MD2	164	96	58,5 <sup>b</sup>

Controle: PBS modificado (Whittingham, 1971).

Valores com letras sobrescritas na mesma coluna indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos, pelo teste do Qui-quadrado.

Tabela 2. Taxa de desenvolvimento de embriões Mcl após manutenção em meios de manipulação por quatro horas, nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Total de embriões	Desenvolvimento embrionário	
		N	%
Controle	243	70	28,8 <sup>a</sup>
MD1	226	118	52,2 <sup>b</sup>
MD2	171	87	50,9 <sup>b</sup>

Controle: PBS modificado (Whittingham, 1971).

Valores com letras sobrescritas na mesma coluna indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos, pelo teste do Qui-quadrado.

Tabela 3. Taxa de desenvolvimento de embriões McII após manutenção em meios de manipulação por quatro horas, nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Total de embriões	Desenvolvimento embrionário	
		N	%
Controle	151	13	8,6 <sup>a</sup>
MD1	143	47	32,9 <sup>b</sup>
MD2	115	36	31,3 <sup>b</sup>

Controle: PBS modificado (Whittingham, 1971).

Valores com letras sobrescritas na mesma coluna indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos, pelo teste do Qui-quadrado.

Entretanto, após manutenção nos meios e posterior cultivo *in vitro*, não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) na taxa de desenvolvimento embrionário entre o Controle, quando comparados com MD1 e com MD2, indicando que os embriões se desenvolvem normalmente após o cultivo, independente dos meios de manutenção (Tab. 4, 5 e 6). Contudo, os embriões McII do MD2 tiveram um maior desenvolvimento ( $P < 0,05$ ) (93%), quando comparado com embriões do Controle (82,5%) e MD1 (83,9%), indicando o efeito benéfico do enriquecimento do meio MD2.

A razão pela qual clivagens mais rápidas acontecem em embriões com maior capacidade de desenvolvimento ainda é desconhecida (Watson e Barcroft, 2001). Um dos mecanismos propostos para explicar estes resultados está na influência do meio MD2 em manter um ambiente favorável aos embriões, estimulando assim, as células totipotentes viáveis (cerca de 50%) (lets, 1998), a continuarem seu desenvolvimento, recompondo com maior rapidez a população de células viáveis da massa celular. Provavelmente, a interação dos substratos energéticos (glicose, piruvato e lactato) presentes no meio MD2, pode ter sido determinante para o maior desenvolvimento embrionário.

Betts e King (2001) e Rizos et al., (2003), em seus estudos, verificaram que a sobrevivência de embriões mamíferos não depende somente de condições apropriadas para o desenvolvimento normal, mas também na aquisição de mecanismos com os quais os embriões utilizam contra as

adversidades. Estudos têm mostrado que soluções suplementadas podem aumentar a produção de blastocistos e o número total de células, provavelmente pela redução do número de blastômeros que sofrem morte celular (Brison e Schultz, 1997; Lighten et al., 1998).

Além disso, em embriões em estágio pré-implantacional, a apoptose ou morte celular pode ser considerada um processo normal, com importante papel durante o desenvolvimento, funcionando inclusive como um indicador da qualidade do embrião (Byrne et al., 1999). Entretanto, quando o número ou razão de células apoptóticas por células normais aumenta, esse evento torna-se prejudicial ao desenvolvimento embrionário, interferindo em sua qualidade (Levy et al., 2001). A incidência de apoptose é maior em embriões produzidos *in vitro* do que *in vivo* (Kninj et al., 2003), provavelmente induzida pelo estresse provocado pelo cultivo *in vitro*, envolvendo atraso no desenvolvimento embrionário acompanhado de fragmentação celular (Jurisicova e Acton, 2004).

Tabela 4. Taxa de desenvolvimento de embriões Bin após manutenção em meios de manipulação e posterior cultivo "*in vitro*" por 10 horas, nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Total de embriões	Desenvolvimento embrionário	
		N	%
Controle	153	149	97,4
MD1	183	175	95,6
MD2	164	151	92,1

Controle: PBS modificado (Whittingham, 1971).

As diferenças não foram significativas ( $P > 0,05$ ) pelo teste do Qui-quadrado.

Tabela 5. Taxa de desenvolvimento de embriões Mcl após manutenção em meios de manipulação e posterior cultivo "*in vitro*" por 10 horas, nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Total de embriões	Desenvolvimento embrionário	
		N	%
Controle	243	232	95,5
MD1	226	204	90,3
MD2	171	159	93,0

Controle: PBS modificado (Whittingham, 1971).

As diferenças não foram significativas ( $P > 0,05$ ) pelo teste do Qui-quadrado.

Tabela 6. Taxa de desenvolvimento de embriões McII após manutenção em meios de manipulação e posterior cultivo “*in vitro*” por 10 horas, nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Total de embriões	Desenvolvimento embrionário	
		N	%
Controle	151	124	82,5 <sup>a</sup>
MD1	143	120	83,9 <sup>a</sup>
MD2	115	107	93,0 <sup>b</sup>

Controle: PBS modificado (Whittingham, 1971).

Valores com letras sobrescritas na mesma coluna indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre tratamentos, pelo teste do Qui-quadrado.

### Conclusões

Deste modo, conclui-se que os meios de manipulação MD1 e MD2 influenciam benéficamente no desenvolvimento de embriões, apresentando superioridade, quando comparado à solução PBS modificado.

### Agradecimentos

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À Germovet por ceder equipamentos e materiais para a realização deste estudo.

### Referências Bibliográficas

**BAVISTER, B.D.** Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, v.29, n.1, p.143-54, 1988.

**BAVISTER, B.D.** Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update*, v.1, n.2, p.91-148, 1995.

**BAVISTER, B.D.** Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology*, v.53, p.619-626, 2000.

**BETTS, D.; KING, W.A.** Genetic regulation of the embryo death and senescence. *Theriogenology*, v.55, n.1, p.171-191, 2001.

**BRISON, D.R.; SCHULTZ, R.M.** Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biology of Reproduction*, Champaign, v.56, p.1088-1096, 1997.

**BYRNE A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON DR.; LEESE, H.J.** Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.117, p.97-105, 1999.

**CHATOT, C.L.; TASCA, R.J.; ZIOMEK, C.A.** Glutamine uptake and utilization by preimplantation mouse embryos in CZB medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.89, p.335-346, 1990.

**COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; FERREIRA, A.M.; GUIMARAES, J.D.; COSTA, A.H.A.** Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos em diferentes sistemas: I – efeito na maturação nuclear. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.49, n.5, p.551-559, 1997.

**DONNAY, I.; LEESE, H.J.** Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Molecular Reproduction and Development*, v.53, n.2, p.171-178, 1999.

**DORLAND, M.; KRUIP, T.A.M.; VAN DER DONK, J.A.** Assessing day 7 bovine embryo viability by measuring the rate of nutrient uptake. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.9, n.27, p.40, 1992.

**GARDNER, D.K.; LEESE, H.J.** Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation mouse embryos. *Human Reproduction*, v.1, n.1, p. 25-27, 1986.

**GARDNER, D.K.; LEESE, H.J.** Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *Journal Reproduction and Fertility Development*, v.88, n.1, p.361-368, 1990.

**GONZALES, D.S.; BAVISTER, B.D.** Zona pellucida escape by hamster blastocysts *in vitro* is delayed and morphologically different compared with zona escape *in vivo*. *Biology of Reproduction*, v.52, p.470-480, 1995.

**GORDON, I.** Laboratory Production of Cattle Embryos. *CAB International*, n.11. Cambridge, UK: University Press, 640p. 1994.

**HOUGHTON, F.D.; LEESE, H.J.** Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.115, p.S92- S96, 2004.

**JURISICOVA, A.; ACTON, B.M.** Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction*, v.128, n.3, p.281-291, 2004.

**KANKA, J.; BRYOVA, A.; DURANTHON, V.; OUDIN, J.F.; PEYNOT, N.; RENARD, J.P.** Identification of differentially expressed mRNA in bovine preimplantation embryos. *Zygote*, v.11, n.1, p.43-52, 2003.

**KHURANA, N.K.; NIEMANN, H.** Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. *Theriogenology*, v.54, n.2, p.313-326, 2000.

**KIM, J.H.; NIWA, K.; LIM, J.M.; OKUDA, K.** Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in vitro*-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biology of Reproduction*, v.48, n.6, p.1320-1325, 1993.

**KNIJN, H.M.; GJORRET, J.O.; VOS, P.L.A.M.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VAN DER WEIJDEN, B.C.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S.J.** Consequences of *in vivo* development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. *Biology of Reproduction*, v. 69, p.1371-1378, 2003.

**LANE, M.; GARDNER, D.K.** Inhibiting 3-phosphoglycerate kinase by EDTA stimulates the development of the cleavage stage mouse. *Molecular Reproduction and Development*, v.60, p.233-240, 2001.

**LEVY, R.R.; CORDONIER H.; CZYBA, J.C.; GUERIN, J.F.** Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, v.106, p.101-108, 2001.

**LIGHTEN, A.D.; MOORE, G.E.; WINSTON, R.M.; HARDY, K.** Routine addition of IGF-I could benefit clinical IVF culture. *Human Reproduction*, v. 13, p.3144-3150, 1998.

**LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MOREIRA, P.M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.** Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vivo* or *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v.69, p.1424-1431, 2003.

**MARTIN, K.L.; LEESE, H.J.** Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, v.40, n.4, p.436-443, 1995.

**MÉNÉZO, Y.; VEIGA, A.; BENKHALIFA, M.** Improved methods for blastocyst formation and culture. *Human Reproduction*, v.13, suppl.4, p.256-265, 1998.

**MORALES, H.; TILQUIN, P.; REES, J.F.; MASSIP, A.; DESSY, F.; VAN LANGENDONCKT, A.** Pyruvate prevents peroxide-induced injury of *in vitro* preimplantation bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v.52, n.2, p.149-157, 1999.

**QUINN, P.; HORSTMAN, F.C.** Is the mouse a good for the human with respect to the development of the preimplantation embryo *in vitro*? *Human Reproduction*, v.13, Suppl.4, p.173-183, 1998.

**RAFFERTY Jr., K.A.** *Methods in experimental embryology of the mouse*. Baltimore: The Johns Hopkins Press, 1970. 78p.

**RIEGER, D.** Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology*, v.37, n.1, p.75-93, 1992.

**RILEY, J.K.; MOLEY, K.H.** Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. *Reproduction*, v.131, n.5, p.823-835, 2006.

**RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.** Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, v.68, p.236-243, 2003.

**ROSENKRANS, C.F.Jr.; ZENG, G.Q.; McNAMARA, G.T.; SCHOFF, P.K.; FIRST, N.L.** Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction*, v. 49, n.3, p.459-462, 1993.

**SAMPAIO, I.B.M.** *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2ªed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 265p, 2002.

**SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (IETS).** *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. 3ªed. Champaign, Illinois: International Embryo Transfer Society, 1998. 180p.

**THOMPSON, J.G.** *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, n.2, p.263-275, 2000.

**VANROOSE, G.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A.** From co-culture to defined medium: State of the art and practical considerations. *Reproduction in Domestic Animals*, v.36, n.1, p.25-28, 2001.

**VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; DE KRUIF, A.** Relationship between timing of development, morula morphology and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in *in vitro* produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v.47, p.47-56, 1997.

**WATSON, A.J.; BARCROFT, L.C.** Regulation of blastocyst formation. *Frontiers in Bioscience*, v.6, p.708–730, 2001.

**WHITTINGHAM D.G.; BIGGERS, J.D.** Fallopian tube and early cleavage in the mouse. *Nature*, v.213, p.942-943, 1967.

**WHITTINGHAM, D.G.** Culture of mouse ova. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.48, Suppl.14, p.7-21, 1971.

## CAPÍTULO 2

### **Morfologia, apoptose celular e expressão gênica Hsp70.3 em embriões após manutenção em diferentes meios de manipulação e posterior cultivo *in vitro***

Flávio Guiseli Lopes<sup>1</sup>; Eduardo Paulino da Costa<sup>2</sup>; Laércio dos Anjos Benjamin<sup>4</sup>; Emílio César Martins Pereira<sup>3</sup>; Marianne Camargos Dias<sup>5</sup>; Gustavo Guerino Macedo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Doutorandos - DVT - UFV

<sup>2</sup> Professor Associado - DVT - Universidade Federal de Viçosa. [epcosta@ufv.br](mailto:epcosta@ufv.br)

<sup>3</sup> Mestrando - DVT - UFV

<sup>4</sup> Professor Associado - DVT - UFV

<sup>5</sup> Bolsista de Iniciação Científica - DVT - UFV

**Resumo** - O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de meios de manutenção em aspectos morfológicos e metabólicos do embrião. Foram utilizados embriões de camundongas nos estádios de blastocisto inicial (Bin), mórula compacta grau I (Mcl) e II (MclI), distribuídos aleatoriamente em três tratamentos, de acordo com o meio de manutenção: T1 - PBS modificado (Controle); T2 (MD1) e T3 (MD2). Os embriões foram mantidos durante quatro horas no meio de manutenção e posteriormente cultivados em meio TCM 199. Após o término do tempo de cultivo, os embriões de cada tratamento, no estágio de blastocisto expandido (Bx), foram separados aleatoriamente em amostras para avaliação de aspectos ultra-estruturais, detecção de apoptose celular e quantificação de expressão gênica de Hsp70.3. Não foi verificada diferença ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos no diâmetro celular, nuclear, nucleolar, na percentagem de células apoptóticas e na relação núcleo:nucléolo. Estes resultados indicam que os meios MD1 e MD2 não interferem nos diâmetros celular, nuclear e nucleolar e no percentual de apoptose. Quanto à expressão gênica de Hsp70.3, foi verificada diferença entre tratamentos ( $P < 0,001$ ), em

embriões Bin, Mcl e McII após manutenção e posterior cultivo *in vitro*. Embora tenha ocorrido maior expressão gênica em embriões mantidos em MD1 e MD2, não houve comprometimento do desenvolvimento embrionário. É provável que a expressão de Hsp70.3 não seja um fator de importância para a avaliação de estresse celular.

Palavras-Chave: avaliação, camundonga, reprodução

*Morphology, apoptosis and genic expression of Hsp70.3 of embryos after maintenance in different manipulation medias following with in vitro culture*

**Abstract** - This work evaluated ultra-structural aspects, cellular apoptosis and genetic expression of mice embryo after maintenance in different manipulation medias. The embryos used in the experiment were all at early blastocyst (Bin), compact morula grade I (Mcl) and II (McII), randomly assigned in three treatments: T1 – modified PBS (Control); T2 (MD1) and T3 (MD2). In each treatment the embryos were kept in manipulation media for four hours. Finishing the manipulation period, the embryos were classified according the development stage and quality. Following, embryos were cultured in modified TCM 199. After the culture period, the embryos were being evaluated accordingly quality and development stage. Following were randomly selected expanded blastocyst (Bx) in each treatment and separated in samples to ultra-structural evaluation, cellular apoptosis and genetic expression quantification of Hsp70.3. There were no difference ( $P>0.05$ ) among the treatments in relation the nucleus, nucleolus, cell diameter and cellular apoptosis rate. Moreover, there were no difference among the treatments in relation the nucleus:nucleolus proportion ( $2.8 \pm 0.4$ ,  $3.8 \pm 2.5$  e  $3.9 \pm 0.4$  microns for T1, T2 and T3 respectively). Thus, these results indicate that MD1 and MD2 do not influence on cell diameter, nucleus and nucleolus apoptosis rate. Otherwise, genetic expression of Hsp70.3 had difference in Bin, Mcl and McII after maintenance followed by *in vitro* culture among the treatments ( $P<0.001$ ). Although it was observed higher genetic expression in embryos maintained in MD1 and MD2, there was not influence on embryo development. Moreover, it is possible that Hsp70.3 expression do not be a important aspect for cellular stress evaluation.

**Keywords:** evaluated, mouse, reproduction

## Introdução

As alterações morfológicas e moleculares embrionárias, causadas pelos sistemas *in vitro* têm sido responsáveis pela menor qualidade e viabilidade após a inovulação ou a criopreservação de embriões (Mc Evoy, 2003). Entre as alterações mais comuns, destaca-se o aumento do número de células apoptóticas, modificações ultra-estruturais, alterações do metabolismo celular e expressão gênica (Lonergan et al., 2003).

As modificações ultra-estruturais em embriões *in vitro* tem sido motivo de muitos estudos para prever a capacidade de desenvolvimento embrionário. Os embriões considerados de grau I possuem núcleo e nucléolos bem mais desenvolvidos do que aqueles de grau II e III (Abe et al., 1999).

A apoptose em células embrionárias tem recebido atenção especial de muitos pesquisadores (Jacobson et al., 1997). Em embriões no estágio pré-implantacional de mamíferos, a apoptose pode ser considerada um processo normal (Byrne et al., 1999). A habilidade do embrião em resistir ao estresse é provavelmente regulada por diversos fatores que permitam a ocorrência de apoptose (Betts & King, 2001). Em embriões produzidos *in vitro* a apoptose pode ser aumentada por subcondições de cultivo, resultante de inadequadas composições dos meios ou da densidade de embriões no meio de cultivo (O'Neil, 1998).

Quanto à expressão gênica, vários agentes, ao gerarem estresse celular, podem induzir a síntese de proteínas de choque (Hsp), além do choque térmico por temperatura (Lindquist & Craig, 1998), estresse oxidativo, mecânico

e por citocinas (Fehrenbach & Niess, 1999). Muitos destes agentes estressantes têm em comum a capacidade de afetarem de modo adverso a conformação correta e, conseqüentemente, a função das proteínas (Minowada & Welch, 1995).

A família da Hsp de 70 kilodaltons (kDa) são expressadas como reflexo de estresse celular (Pedersen et al., 2005). Evidências sugerem que tanto a Hsp70.1 como a 70.3 desempenham papel importante no processo de fertilização e no desenvolvimento embrionário (Dix et al., 1998). Assim, a expressão gênica embrionária pode ser modificada em resposta a alterações de ambiente, o que provavelmente é uma tentativa do embrião em estabilizar sua função celular.

O objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos morfológicos, apoptose celular e expressão gênica em embriões de camundongas, após manutenção em diferentes meios de manipulação e posterior cultivo *in vitro*.

### **Material e Métodos**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal – DVT/UFV, utilizando embriões de camundongas da espécie *Mus musculus*, da linhagem Suíça-Albina. O protocolo de superovulação e coleta de embriões foi realizado segundo Rafferty (1970). Os aspectos éticos foram rigidamente considerados, sendo o projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, processo 10/2006, em reunião realizada no dia 26 de abril de 2006.

Foram testados dois meios de manipulação utilizados para coleta e manipulação de embriões, MD1\* e MD2\* e como controle o PBS modificado (Whittingham, 1971), usualmente empregado nas rotinas de TE nas diferentes espécies animais. A composição do meio MD1 foi definida da seguinte maneira: Cloreto de Sódio ( $0,1027 \text{ mol L}^{-1}$ ); Cloreto de Potássio ( $0,0040 \text{ mol L}^{-1}$ ); Cloreto de Cálcio ( $0,0018 \text{ mol L}^{-1}$ ); Lactato de Sódio ( $0,0277 \text{ mol L}^{-1}$ ). O MD2 foi elaborado com a mesma formulação do MD1, acrescido de  $0,0003 \text{ mol L}^{-1}$  de Piruvato de Sódio.

A solução fosfatada tamponada (PBS) foi formulada por Dulbecco & Vogt em 1954 para uso em manipulação de cultivos bacterianos e, posteriormente, modificada por Whittingham em 1971, para a manipulação de embriões de camundongos. Com o sucesso obtido pelo pesquisador, poucos estudos foram realizados no intuito de encontrar soluções mais apropriadas e estáveis para a manipulação de embriões nas diferentes espécies animais. O PBS modificado, está sujeito a eventuais mudanças na composição, como variações de pH, quando armazenado por longo período de tempo em temperatura e à luz ambiente (Gordon, 1994). Portanto, a solução deve ser armazenada em local com pouca luminosidade, em ambiente refrigerado (temperatura mínima de  $4^{\circ}\text{C}$ ). Os meios MD1 e MD2 são estáveis e menos complexos.

Os meios MD1 e MD2 foram produzidos e ajustados com glicose para  $290 \text{ mOsm}$ , com o auxílio de um osmômetro (Osmette A<sup>®</sup> Automatic Osmometer) e o pH ajustado para 7,2 a 7,4. Todos os reagentes utilizados para a produção dos meios de manipulação e de cultivo foram testados para cultivo

---

\* Patente solicitada.

\*

celular. Além disso, os antibióticos utilizados para os meios MD1 e MD2 foram os mesmos utilizados no PBS modificado (Whittingham, 1971).

Para o estudo, foram utilizados apenas embriões nos estádios de blastocisto inicial (Bin), mórula compacta grau I (Mcl) e II (McII), distribuídos aleatoriamente em três tratamentos: T1 – PBS modificado (Controle); T2 (MD1) e T3 (MD2).

Os embriões de cada tratamento foram mantidos em placas de quatro poços (Nunc® A/S), durante quatro horas, no meio de manipulação, previamente equilibrado (37°C) e acrescido de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA), fração V.

Após o término do tempo de manipulação, os embriões foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e quanto à qualidade embrionária (Iets, 1998), com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus Optical®, modelo SZ-40/ SZ-ST) em ocular de 10X e objetiva de 4X. Depois de classificados, os embriões foram transferidos e cultivados em placas de quatro poços (Nunc® A/S), durante 10 horas, em meio de cultivo TCM 199 modificado (Costa et al., 1997), previamente equilibrado (37°C), em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora (Jouan®, modelo IG 150).

Após o término do tempo de cultivo, os embriões foram transferidos e lavados em placa escavada, em meio Talp-Hepes modificado (Costa et al., 1997), previamente equilibrado (37°C), sendo classificados novamente quanto ao estágio de desenvolvimento e quanto à qualidade embrionária (Iets, 1998), com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus Optical®, modelo SZ-40/ SZ-ST) em ocular de 10X e objetiva de 4X.

### **Microscopia eletrônica de transmissão (MIT)**

Para avaliação em microscopia eletrônica foram adotados os procedimentos de Costa (1994). Para cada tratamento foram utilizados embriões que, após o término do tempo de cultivo, se apresentavam no estágio Bx.

Após a inclusão dos embriões (Costa, 1994), foram realizados cortes semifinos (0,5  $\mu\text{m}$ ), com navalha de vidro em ultramicrótomo, a fim de triar os cortes sob microscopia óptica, selecionando-se as melhores para cortes ultrafinos (60-70 nm). Os cortes ultrafinos foram obtidos com navalha de diamante e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Depois os cortes ultrafinos foram avaliados em microscopia eletrônica de transmissão (Zeiss®, modelo EM 109).

### **Detecção de apoptose celular**

Para a detecção de apoptose celular foi utilizado a técnica de TUNEL (Terminal transferase mediated Uracil Nick End Labeling) e o Kit APO-BrdU™ Assay (Invitrogen®, CA, USA). Para cada tratamento foram utilizados cinco embriões que após o término do tempo de cultivo se apresentavam no estágio Bx.

Os embriões de cada tratamento foram fixados em lâmina e processados de acordo com as instruções do fabricante do kit. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência de luz verde, com objetiva de 40X. As células que apresentaram com coloração verde foram consideradas células TUNEL positivas.

As variáveis quantitativas (microscopia eletrônica de transmissão e apoptose celular) foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran) e, posteriormente, à análise de variância. Quando apresentada significância, foi realizado o teste de comparação de médias de Duncan. Quando não atendidas as premissas de Normalidade e Homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal Wallis (Saeg, 1999).

### **Análise de expressão gênica**

Para quantificação de expressão gênica foi utilizado a técnica RT-PCR em tempo real, sendo avaliados dois genes, um endógeno ( $\beta$ -Actin) e um relacionado ao estresse térmico (Hsp70.3) (Tabela 1). Para cada tratamento, foram utilizados três amostras (de 10 embriões cada), em duplicata, que no momento da coleta se apresentavam nos estádios de Bin, Mcl e Mcll, respectivamente e, após o término do tempo de cultivo se apresentavam no estágio de Bx.

Para a extração do RNA foi utilizado o Kit Rneasy (Qiagen<sup>®</sup>; CA; USA) e para a síntese de primeira fita de DNA o Kit Superscript III First Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen<sup>®</sup>, CA; USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Os *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes foram desenhados por meio do programa *PrimerQuest* ([www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest](http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest)) fornecido pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA) a partir de seqüências de nucleotídeos obtidas do banco de dados do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A

especificidade dos *primers* foi verificada em gel de agarose 2% e a análise das curvas de dissociação possibilitou verificar a temperatura de desnaturação do produto amplificado, permitindo diferenciar produtos inespecíficos dos produtos esperados.

Tabela 1. Seqüência de *primers* e temperatura de anelamento (TA) específicas para cada gene avaliado.

Genes		Primers (seqüência 5'-3')	TA (°C)
β-Actin	Forward	5' TCTTGGGTATGGAATCCTGTGGCA 3'	60,1
	Reverse	5' AGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGT 3'	59,5
Hsp70.3	Forward	5' CGCTCGAATCCTATGCCTTCAACA 3'	58,9
	Reverse	5' GCACTTGTCCAGCACCTTCTTCTT 3'	59,4

A eficiência de amplificação de cada gene foi calculado por meio da construção de uma curva de diluição em série de cDNA nas concentrações de 1, 10, 100 e 200 ng por reação. Foram consideradas eficientes aquelas reações em que a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene referência foram aproximadamente iguais, com tolerância de 10% de variação em relação ao controle endógeno, tal como descrito por Livak & Schmittgen (2001).

A partir dos dados obtidos, um gráfico de Ct (*threshold cycle*) versus o  $\log_{10}$  da quantidade de cDNA utilizado na reação foi produzido. Foi utilizado a regressão linear para determinação do coeficiente angular da reta para determinar a eficiência de amplificação, de acordo com a equação desenvolvida por Pfaffl (2001). Depois de verificada a eficiência do gene alvo e para o controle endógeno, foram escolhidas a diluição de cDNA e a concentração de *primer* que apresentavam maior eficiência para preparar as reações de quantificação relativa.

As reações RT-PCR em tempo real foram efetuadas em termociclador *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems; CA; USA),

utilizando o Kit de SYBR Green® PCR Máster Mix (Applied Biosystems; CA; USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit contém todos os componentes (exceto *primer* e molde), necessários para as reações de PCR: tampão 2X, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA polimerase e ROX como referência passiva. As reações continham 12,5 µL desse mix, 5 µL de cDNA, *primer* e água, totalizando um volume final de 25 µL. As concentrações de *primer* e de cDNA foram otimizadas anteriormente para cada gene.

As condições de amplificação para todos os sistemas foram: 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos; (anelamento) e extensão a 60°C durante 60 segundos. Ao final dos 40 ciclos de amplificação, um passo adicional com elevação gradual da temperatura de 60°C a 94°C foi utilizado para obtenção da curva de dissociação. A amplificação dos genes alvo e da referência endógena foi realizado em diferentes canaletas na mesma placa de reação. Todas as reações para um mesmo gene alvo foram feitas em duplicatas em placas ópticas de 96 poços, seladas com filme adesivo. Os dados obtidos na reação de qPCR foram gerados pelo equipamento na forma de valores de C<sub>t</sub>, que representam o ciclo de início da detecção do produto amplificado. Os valores médios de C<sub>t</sub> foram subtraídos entre si pelo cálculo de  $\Delta C_t$  (C<sub>t</sub> do alvo - C<sub>t</sub> da referência endógena), a fim de minimizar as possíveis variações quanto à quantidade de mRNA inicial e à eficiência na transcrição reversa. A quantidade de alvo, normalizada para a referência endógena, foi calculada pela fórmula  $2^{-\Delta C_t}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

Os dados obtidos foram analisados pelo programa REST® (Pfaffl et al., 2002), disponível em <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification> que utiliza o

modelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*<sup>®</sup> para comparar a expressão entre as amostras dos tratamentos. Este modelo tem a vantagem de não assumir nenhum tipo de distribuição e de se adequar a dados cuja variância pode ser grande, quando não é possível a aplicação de testes paramétricos. O *software* REST<sup>®</sup> foi desenvolvido com base em teste de permutação, que consideram os resultados obtidos a partir de permutações aleatórias dos dados do experimento, sendo realizado da seguinte maneira: a taxa de expressão é calculada para os dados experimentais, então os dados são permutados (rearranjados) repetidamente e a cada permutação é calculado o diferencial da taxa de expressão para cada par de dados e esses são comparados aos dados experimentais.

### **Resultados e Discussão**

Quanto aos aspectos morfológicos (diâmetros celular, nuclear, nucleolar e na relação núcleo:nucléolo) não foi verificada diferença ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos (Tabela 2). Estes resultados indicam que os meios MD1 e MD2 não interferem nos diâmetros celular, nuclear, nucleolar e na relação núcleo:nucléolo de embriões.

Sabe-se que o tamanho do nucléolo está relacionado com a capacidade de síntese protéica celular, onde células que sintetizam proteínas ativamente têm nucléolos mais conspícuos que outros tipos celulares, motivo pelo qual, nucléolos de embriões ou tecidos que crescem rapidamente, apresentam nucléolos bem evidentes (Junqueira & Carneiro, 1987). Em embriões considerados de grau I o núcleo e nucléolos são bem mais desenvolvidos do que aqueles de grau II e III (Abe et al., 1999). Isto sugere, que os meios MD1 e

MD2 não influenciam no desenvolvimento celular embrionário, pois não houve estímulos metabólicos suficientes para o maior desenvolvimento de nucléolos. A associação dos substratos energéticos presentes no MD1 e MD2 não levaram a alterações significativas, mantendo o comportamento distinto entre as células embrionárias.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão (micras) do diâmetro celular (DC), diâmetro nuclear (DN), diâmetro nucleolar (DNC) e relação núcleo:nucléolo (RNN) em embriões Bx após manutenção e posterior cultivo *in vitro*, nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	DC	DN	DNL	RNN
	X±DP	X±DP	X±DP	X±DP
Controle	15,0±7,1	6,6±1,7	2,4±0,6	2,8±0,4
MD1	25,6±10,5	9,8±7,1	2,5±0,3	3,8±2,5
MD2	17,3±7,6	6,5±1,7	1,7±0,6	3,9±0,4

Controle: PBS modificado (Whittingham, 1971).

As diferenças não foram significativas ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de comparação de médias Duncan;

X=média; DP=desvio padrão;

As características apoptóticas, incluindo fragmentação do DNA nuclear, são raramente observadas antes da fase de compactação celular, já na fase de blastocisto, a presença de apoptose é freqüente e espontânea em mamíferos como: em humanos (Hardy, 1999); camundongos (Brison & Schultz, 1997) e vacas (Matwee et al., 2000). Durante o desenvolvimento do embrião, muitas das células embrionárias que se encontram em processo de apoptose já cumpriram a sua função e precisam ser excluídas ou substituídas por células da mesma linhagem ou diferentes (Sanders & Wride, 1996).

Em embriões em estágio pré-implantacional, a apoptose pode ser considerada um processo normal com importante papel durante o desenvolvimento, funcionando inclusive como um indicador de qualidade do embrião (Byrne et al., 1999). Entretanto, quando o número ou razão de células

apoptóticas por células normais aumenta, esse evento torna-se prejudicial ao desenvolvimento embrionário, interferindo em sua qualidade (Levy et al., 2001).

No presente estudo, o número de células apoptóticas foi similar entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). As médias e desvios-padrão do número de células apoptóticas para os diferentes tratamentos foram: Controle =  $38,0 \pm 10,7$ ; MD1 =  $37,1 \pm 11,4$  e MD2 =  $40,0 \pm 9,6$ . Estes resultados indicam que os meios MD1 e MD2 não interferem no número de células após quatro horas de manipulação e condizem com os encontrados na literatura.

Segundo Warner et al. (1998), em embriões de camundongas, cerca de 15 a 50% das células morrem durante o período de pré-implantação por mecanismos ainda pouco elucidados. A variabilidade na incidência de apoptose em embriões de mamíferos é influenciada por diversos fatores, sendo sua incidência maior em embriões em estágio pré-implantacional. Entretanto, poucos trabalhos relatam separadamente a incidência de apoptose em embriões nos estádios de blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido. Sabe-se que a maior incidência de células apoptóticas é encontrada em embriões no estágio de blastocisto expandido (Fabian et al., 2005; Fabian et al., 2007).

A apoptose em células embrionárias tem recebido atenção especial devido a seu potencial em responder a subcondições de desenvolvimento ou a estresses (Betts & King, 2001). O aumento da incidência de morte celular é um importante indicador de um ambiente inadequado para o embrião tanto *in vivo* como *in vitro*. Por esta razão, pode-se prever que o MD1 e MD2 mantiveram um ambiente favorável aos embriões, não influenciando no desenvolvimento normal dos mesmos.

Hardy (1997), em seus estudos, verificou que embriões de camundongos coletados no estágio de blastocisto desenvolvem-se normalmente, mesmo apresentando boa parte das suas células em apoptose, reforçando aí, a idéia de que o processo de morte celular programada é fundamental para a manutenção do desenvolvimento embrionário.

Após manutenção por quatro horas nos meios e posterior cultivo *in vitro*, não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) na taxa de desenvolvimento embrionário entre o Controle (97,4 e 95,5% para embriões Bin e Mcl, respectivamente), quando comparados com MD1 (95,5 e 90,3% para embriões Bin e Mcl, respectivamente) e com MD2 (92,1 e 90,3% para embriões Bin e Mcl, respectivamente), indicando que os embriões se desenvolvem normalmente após o cultivo, independente dos meios de manutenção. Contudo, os embriões MclI do MD2 tiveram um maior desenvolvimento ( $P < 0,05$ ) (93%), quando comparado com embriões do Controle (82,5%) e MD1 (83,9%), indicando o efeito benéfico do enriquecimento do meio MD2.

Quanto à expressão gênica de Hsp70.3, com o auxílio do software REST® foi possível realizar as comparações entre as amostras dos tratamentos (Tabela 3). Considerando as amostras Bin, os MD1 e MD2 expressaram 1,421 e 12,889 vezes mais Hsp70.3 quando comparado o Controle, sendo este valor superior, respectivamente ( $P < 0,001$ ). Porém, verificou-se que o MD2 expressou 9,071 vezes mais Hsp70.3 do que o MD1 ( $P < 0,001$ )

Da mesma forma, para as amostras Mcl, o MD1 e MD2 expressaram 4,129 e 1,373 vezes mais Hsp70.3 quando comparado com o Controle, sendo este valor superior, respectivamente ( $P < 0,001$ ). Ao comparar o MD1 com o MD2, foi verificada expressão 3,007 vezes para o MD1 ( $P < 0,001$ ). Já, para as

amostras MclI, o MD1 e o MD2 expressaram 20,959 e 9,217 vezes mais Hsp70.3 quando comparado a solução PBS modificado, sendo este valor superior, respectivamente ( $P < 0,001$ ). Ao comparar o MD1 ao MD2 foi verificada expressão 2,274 superior para a MD1 ( $P < 0,001$ ).

Com base nestes resultados, foi possível verificar diferença no perfil de expressão de Hsp70.3 em embriões Bin, Mcl e MclI após manutenção e posterior cultivo *in vitro* entre os tratamentos ( $P < 0,001$ ). Embora tenha ocorrido maior expressão de Hsp70.3 em embriões mantidos no MD1 e no MD2, não houve comprometimento do desenvolvimento embrionário.

Tabela 3. Expressão relativa do gene entre as amostras dos tratamentos.

Gene	Amostras	Expressão relativa		
		Cnt vs MD1	Cnt vs MD2	MD1 vs MD2
Hsp70.3	Bin	1,421	12,889	9,071
	Mcl	4,129	1,373	3,007
	MclI	20,959	9,217	2,274

Houve diferença entre tratamentos ( $P < 0,001$ ).

Cnt = Controle: PBS modificado de Whittingham (1971).

No entanto, as diferenças encontradas podem estar relacionadas com a utilização das soluções de manipulação. Segundo Matwee et al. (2000), a expressão gênica embrionária pode ser modificada em resposta a alterações do ambiente, o que provavelmente é uma tentativa do embrião para estabilizar sua função celular.

Os meios MD1 e MD2 são compostos de substratos energéticos que possuem efeito positivo para o desenvolvimento embrionário, desta forma, é provável que o perfil de expressão gênica encontrado não seja suficiente para comprometer a qualidade e a sobrevivência dos embriões no estágio pré-implantacional. Haja vista, que uma das principais funções da Hsp70 está na

habilidade em regular a morte celular, podendo contribuir com seu efeito protetor nas células. Entretanto, esse mecanismo ainda não está esclarecido e poucos estudos dessa natureza são realizados (Park et al., 2006). Beckmann et al. (1992) e Dix et al. (1998), trabalhando com embriões de camundongos, verificaram que quantidades mínimas de Hsp70.1 e Hsp70.3 são necessárias para o desenvolvimento normal da embriogênese pré-implantacional.

Outro aspecto importante seria a relação das Hsp com a apoptose, porém não se sabe ao certo qual seria o mecanismo exato onde essas proteínas atuariam com conseqüente inibição da morte celular programada. Entretanto, alguns pesquisadores têm demonstrado que a citoproteção induzida pelas Hsp pode também ser atribuída parcialmente à supressão da apoptose, embora o preciso mecanismo desse efeito ainda não esteja elucidado (Samali & Orrenius, 1998).

### **Conclusões**

Conclui-se que os meios produzidos e testados (MD1 e MD2) podem ser utilizados como meios de manipulação de embriões, em substituição ao PBS modificado. Estes dois meios não comprometem a capacidade de desenvolvimento dos embriões.

### **Agradecimentos**

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À Labtec por ceder equipamentos e materiais para a realização deste estudo.

À Germovet por ceder equipamentos e materiais para a realização deste estudo.

#### Literatura Citada

- Abe, H.; Yamashita, S.; Itoh, T. et al. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. **Embryo Development**, v.53, n.3, p.325-335, 1999.
- Beckmann, R.P.; Lovett, M.; Welch, M.J. Examining the function and regulation of Hsp70 in cells subjected to metabolic stress. **Journal of Cell Biology**, v.117, p.1137-1150, 1992.
- Betts, D.; King, W.A. Genetic regulation of the embryo death and senescence. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.171-191, 2001.
- Brison, D.R.; Schultz, R.M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.56, p.1088-1096, 1997.
- Byrne A.T.; Southgate, J.; Brison DR.; Leese, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.117, p.97-105, 1999.
- Costa, E.P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultra-estruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “in vitro”**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1994. 155p. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.
- Costa, E.P.; Vale Filho, V.R.; Nogueira, J.C. et al. Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos em diferentes sistemas: I – efeito na maturação nuclear. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.5, p.551-559, 1997.
- Dix, D.J.; Garges, J.B.; Hong, R.L. Inhibition of hsp70-1 and hsp70-3 expression disrupts preimplantation embryogenesis and heightens embryo sensitivity to arsenic. **Molecular Reproduction and Development**, n.51, p.373-380, 1998.
- Fabian, D.; Koppel, K.J.; Hyttel-Maddox, P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. **Theriogenology**, n.64, p.221-231, 2005.
- Fabian, D.; Makarevich, A.V.; Chrenek, P. et al. Chronological appearance of spontaneous and induced apoptosis during preimplantation development of rabbit and mouse embryos. **Theriogenology**, n.68, p.1271-1281, 2007.
- Fehrenbach, E.; Niess, A. Role of heat shock protein in the exercise response. **Exercise Immunology Review**, v.5, p.57-77, 1999.
- Gordon, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. CAB International, n.11. Cambridge, UK: University Press, 1994. 640p.
- Hardy, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.919-925, 1997.

- Hardy, K. Apoptosis in the human embryo. **Reproduction**, v.4, p.125–134, 1999.
- Jacobson, M.D.; Weil, M.; Raff, M.C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v.88, p.347-354, 1997.
- Junqueira, L.C.U.; Carneiro, J. **Biologia celular e molecular**. 4<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1987. p.143-197.
- Levy, R.R.; Cordonier H.; Czyba, J.C. et al. Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v.106, p.101-108, 2001.
- Lindquist, S.; Craig, E.A. The heat shock proteins. **Annual Reviews Genetics**, v.22, p.631-677, 1998.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- Lonergan, P.; Rizo, D.; Kanka, J. et al. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**, v.126, n.3, p.337-346, 2003.
- Matwee, C.; Betts, D.H.; King, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v.8, p.57-68, 2000.
- Mc Evoy, T.G. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. **Reproduction Domestic Animal**, v.38, p.268-275, 2003.
- Minowada, G.; Welch, W.I. Clinical implications of the stress response. **Journal of Clinical Investigation**, v.95, p.03-12, 1995.
- O'Neil, C. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos in vitro. **Biology of Reproduction**, v.58, p.1303-1309, 1998.
- Park, S.Y.; Kim, E.Y.; Cui, X.S. et al. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. **Zygote**, v.14, p.125-131, 2006.
- Pedersen, M.E.; Ozdas, O.B.; Farstad, W. et al. Effects of bovine oviduct epithelial cells, fetal calf serum and bovine serum albumin on gene expression in single bovine embryos produced in the synthetic oviduct fluid culture system. **Reproduction Fertility and Development**, v.17, n.8, p.751-757, 2005.
- Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, p.45, 2001.
- Pfaffl, M.W.; Georgieva, T.M.; Georgiev, I.P. et al. Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. **Domestic Animal Endocrinology**, v.22, p.91, 2002.
- Rafferty, Jr.K.A. **Methods in experimental embryology of the mouse**. Baltimore: The Johns Hopkins Press, 1970. 78p.
- Samali, A.; Orrenius, S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. **Cell Stress Chaperones**, v.3, p.228-236, 1998.
- Sanders, E.J.; Wride, M.A. Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique. **Histochemical Journal**, v.28, p.275-281, 1996.

- SISTEMA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA E GENÉTICA (SAEG). **Manual do usuário**. Versão 8.0. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Central de Processamento de Dados, 1999. 138p.
- SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (IETS). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3ªed. Champaign, Illinois: International Embryo Transfer Society, 1998. 180p.
- Warner, C.M.; Mcelhinny, A.S.; Wu, L. et al. Role of the Ped gene and apoptosis genes in control of preimplantation development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.15, p.331-337, 1998.
- Whittingham, D.G. Culture of mouse ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.48, Suppl.14, p.7-21, 1971.

### **CAPÍTULO 3**

#### **Número total de células e diâmetro de embriões mantidos previamente em diferentes meios de manipulação**

Flávio Guiselli Lopes<sup>1</sup>; Eduardo Paulino da Costa<sup>2</sup>; Emílio César Martins Pereira<sup>3</sup>; Tarcízio Rêgo de Paula<sup>4</sup>; Giancarlo Magalhães dos Santos<sup>1</sup>; Fabrício Albani Oliveira<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Doutorandos - DVT - UFV

<sup>2</sup> Professor Associado - DVT - Universidade Federal de Viçosa. [epcosta@ufv.br](mailto:epcosta@ufv.br)

<sup>3</sup> Mestrando - DVT - UFV

<sup>4</sup> Professor Associado - DVT - UFV

<sup>5</sup> Doutorando - DZO - UFV

**Resumo** - O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes meios de manutenção na taxa de clivagem e o diâmetro de embriões de camundongas. Para o estudo, foram utilizados embriões nos estádios de blastocisto inicial (Bin), mórula compacta grau I (Mcl) e II (MclI), distribuídos aleatoriamente em três tratamentos: T1 – PBS modificado (Controle); T2 (MD1) e T3 (MD2). Os embriões foram mantidos durante quatro horas no meio de manutenção e posteriormente classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e quanto à qualidade embrionária. Logo após, foram cultivados em meio TCM 199 e classificados novamente quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária. Depois de classificados, os embriões foram submetidos à contagem do número total de células e à avaliação morfológica. Não foi verificada diferença ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos no número total de células ( $54,1 \pm 10,7$ ;  $55,5 \pm 11,4$  e  $53,2 \pm 9,6$  para Controle, MD1 e MD2, respectivamente). Também foi observado diferença ( $P > 0,05$ ) no diâmetro entre tratamentos embriões, após a manutenção e posterior cultivo *in vitro* ( $96,7 \pm 10,5$ ;  $97,4 \pm 10,8$  e  $97,7 \pm 9,3$  micras para os tratamentos Controle, MD1 e MD2, respectivamente). Entretanto, os embriões Bin mantidos no meio MD2 expandiram ( $P < 0,05$ ) durante o período de manutenção ( $74,4 \pm 7,0$ ;  $76,5 \pm 7,7$  e  $78,9 \pm 7,3$  micras para os tratamentos Controle, MD1 e MD2, respectivamente), indicando que, mesmo em condições inadequadas de atmosfera (meio ambiente), o MD2 foi favorável para o desenvolvimento embrionário de blastocistos. Estes resultados demonstram que os meios de manipulação MD1 e MD2 não interferem na taxa de clivagem embrionária, podendo ser utilizado em substituição a solução PBS modificado.

Palavras-Chave: Camundonga, embrião, reprodução

*Total number of cells and diameter of embryos kept in different manipulation  
media*

**Abstract** - The aim of this study was evaluate the cleavage rate and the diameter of mice embryos kept in different manipulation medias. The embryos used in the experiment were all at early blastocyst (Bin), compact morula grade I (Mcl) and II (McII), randomly assigned in three treatments: T1 – modified PBS (Control); T2 (MD1) and T3 (MD2). In each treatment the embryos were kept in manipulation media for four hours. Finishing the manipulation period, the embryos were classified according the development stage and quality. Following, embryos were cultured in modified TCM 199. After the culture period, the embryos were being evaluated accordingly quality and development stage. After classified, embryos were randomly assigned and had counted cell number as well morphometric evaluation. To obtain the total cell number it was used 35 embryos on Bx stage for each treatment. For morphometric evaluation, were used 35 Bin, Mcl and McII embryos which after the culture period were at Bx stage. It was not verified difference ( $P>0.05$ ) between the treatments on total cell number ( $54.1 \pm 10.7\%$ ;  $55.5 \pm 11.4\%$  and  $53.2 \pm 9.6\%$ , for Control, MD1 and MD2, respectively). These data demonstrate that the medias MD1 and MD2 did not influence the embryonic cleavage rate, suggesting that they can replace the modified PBS. In relation of embryo morphometry (diameter), there was no difference ( $P>0.05$ ) between the treatments, using embryos Bin, Mcl and McII after maintenance followed by *in vitro* culture ( $96.7 \pm 10.5$ ;  $97.4 \pm 10.8$  e  $97.7 \pm 9.3$  microns for Control, MD1 and MD2, respectively), indicating that even in inadequate conditions of atmosphere, MD2 was propitious to the blastocyst development and both medias not interfere in clivage rates and afford being used to substitute the PBS modified solution.

**Keywords:** Mouse, embryo, reproduction

## Introdução

O aprimoramento das técnicas envolvidas no processo de cultivo *in vitro* de embriões têm sido de fundamental importância para o estudo e a compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem

durante o desenvolvimento embrionário. De acordo com Greve et al. (1993) e Van Soom et al. (1996), o número total de células existentes no embrião é de fundamental importância para a continuidade de seu desenvolvimento.

A contagem do número total de células tem sido utilizada com frequência para avaliar a qualidade do embrião (Bowman & McLaren, 1970; Chung, 1973; Whittingham, 1974; Thompson, 1997; Enright et al., 2000 e Viuff et al., 2001), sendo influenciado pelo ambiente de desenvolvimento no qual está inserido (Knijn et al., 2003). Mori et al. (2002) e Hoelker et al. (2006), trabalhando com embriões bovino, verificaram correlação positiva entre o número total de células e o diâmetro de embriões produzidos *in vitro*, sendo utilizado como parâmetro para qualidade e viabilidade embrionária. O desenvolvimento fetal normal é dependente do número de células totais do embrião (Lane & Gardner, 1997).

A manutenção do embrião em uma solução adequada, desde a coleta até a inovulação, é um aspecto importante, uma vez que pode interferir na qualidade e, conseqüentemente, na viabilidade embrionária (Bavister, 1995). De acordo com Vanroose et al. (2001), a escolha de meios e substratos energéticos têm impacto importante sobre o desenvolvimento e a viabilidade de embriões.

Atualmente, a solução de manipulação empregada nas rotinas de transferência de embriões em bovinos têm sido o PBS modificado (Whittingham, 1971). O PBS foi formulado por Dulbecco & Vogt em 1954 para uso em manipulação de cultivos bacterianos e, posteriormente, modificado por Whittingham em 1971, para a manipulação de embriões de camundongos. Posteriormente, poucos estudos foram realizados no intuito de encontrar

soluções mais apropriadas e estáveis para a manipulação de embriões nas diferentes espécies animais.

O PBS modificado (Whittingham, 1971), está sujeito a eventuais mudanças na composição, como variações de pH, quando armazenado por longo período de tempo em temperatura e à luz ambiente (Gordon, 1994). Portanto, a solução deve ser armazenada em local com pouca luminosidade, em ambiente refrigerado (temperatura mínima de 4°C).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de clivagem e o diâmetro de embriões de camundongas após manutenção em diferentes meios de manipulação.

### **Material e Métodos**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal – DVT/UFV, utilizando embriões de camundongas da espécie *Mus musculus*, da linhagem Suíça-Albina, provenientes do Biotério Central – CCB/UFV, no período de janeiro de 2008 a fevereiro de 2009.

A partir do protocolo de superovulação convencional (Rafferty, 1970), as fêmeas doadoras de embriões foram induzidas a superovulação mediante a administração de 10 UI (0,1 mL) de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) (Novormon®; Syntex SA; Argentina), via intra-peritoneal, seguida da administração de 10 UI (0,1 mL) de gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Vetecor®; Calier S.A.; Espanha), via intra-peritoneal, 48 horas após. Depois da administração do hCG, as fêmeas foram colocadas em gaiolas individuais para o acasalamento, na proporção de duas fêmeas para cada macho, por 24 horas.

Após 60 a 80 horas do acasalamento, as fêmeas doadoras foram submetidas à eutanásia para posterior coleta dos embriões. Os aspectos éticos foram rigidamente considerados, sendo o projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, processo 10/2006, em reunião realizada no dia 26 de abril de 2006.

No laboratório, as fêmeas tiveram sua cavidade abdominal aberta, os cornos uterinos e útero removidos e distribuídos aleatoriamente em placas de Petri pequena, contendo o meio de manipulação para cada tratamento. A coleta dos embriões foi precedida da lavagem dos cornos uterinos e útero, no sentido corno uterino – útero, por onde se perfundi o meio de manipulação, previamente equilibrado (37°C), mediante o uso de uma seringa de 3 mL acoplada a uma agulha hipodérmica (30 x 0,70 mm, 22G).

Foram testados dois meios de manipulação utilizados para coleta e manipulação de embriões, MD1\* e MD2\* e como controle o PBS modificado (Whittingham, 1971), usualmente empregado nas rotinas de TE nas diferentes espécies animais. A composição do meio MD1 foi definida da seguinte maneira: Cloreto de Sódio (0,1027 mol L<sup>-1</sup>); Cloreto de Potássio (0,0040 mol L<sup>-1</sup>); Cloreto de Cálcio (0,0018 mol L<sup>-1</sup>); Lactato de Sódio (0,0277 mol L<sup>-1</sup>). O MD2 foi elaborado com a mesma formulação do MD1, acrescido de 0,0003 mol L<sup>-1</sup> de Piruvato de Sódio. A solução PBS foi formulada primeiramente por Dulbecco & Vogt em 1954 e, posteriormente, modificado por Whittingham em 1971.

Os meios MD1 e MD2 foram produzidos e ajustados com glicose para 290 mOsm, com o auxílio de um osmômetro (Osmette A<sup>®</sup> Automatic Osmometer) e o pH ajustado para 7,2 a 7,4. Todos os reagentes utilizados para

---

\* Patente solicitada.

\*

a produção dos meios de manipulação e de cultivo foram testados para cultivo celular. Além disso, os antibióticos utilizados para os meios MD1 e MD2 foram os mesmos utilizados no PBS modificado (Whittingham, 1971).

Para o estudo, foram utilizados apenas embriões nos estádios de blastocisto inicial (Bin), mórula compacta grau I (Mcl) e II (McII), distribuídos aleatoriamente em três tratamentos: T1 – PBS modificado (Controle); T2 (MD1) e T3 (MD2).

Os embriões de cada tratamento foram mantidos em placas de quatro poços (Nunc® A/S), durante quatro horas, no meio de manipulação, previamente equilibrado (37°C) e acrescido de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA), fração V.

Após o término do tempo de manipulação, os embriões foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e quanto à qualidade embrionária (IETS, 1998), com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus Optical®, modelo SZ-40/ SZ-ST) em ocular de 10X e objetiva de 4X. Depois de classificados, os embriões foram transferidos e cultivados em placas de quatro poços (Nunc® A/S), durante 10 horas, em meio de cultivo TCM 199 modificado (Costa et al., 1997), previamente equilibrado (37°C), em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora (Jouan®, modelo IG 150).

Após o término do tempo de cultivo, os embriões foram transferidos e lavados em placa escavada, em meio Talp-Hepes modificado (Costa et al., 1997), previamente equilibrado (37°C), sendo classificados novamente quanto ao estágio de desenvolvimento e quanto à qualidade embrionária (IETS, 1998), com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus Optical®, modelo SZ-

40/ SZ-ST) em ocular de 10X e objetiva de 4X. Depois de classificados, os embriões foram separados aleatoriamente e submetidos à contagem do número total de células e à avaliação morfométrica.

A contagem do número total de células dos embriões foi realizada após o término do tempo de cultivo (22:00 h), de acordo com a metodologia proposta por Fukui & Ono (1989), com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus Optical®, modelo SZ-40/ SZ-ST) em ocular de 10X e objetiva de 4X. Para cada tratamento foram utilizados 35 embriões que após o término do tempo de cultivo se apresentavam no estágio inicial de Bx.

A avaliação morfométrica dos embriões foi realizada em três períodos de tempo, com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus Optical®, modelo SZ-40/ SZ-ST), dotado de retículo micrométrico (1 mm de lado e 100 subdivisões) em ocular de 10X e objetiva de 4X. Para cada tratamento foram utilizados 35 embriões que, no momento da coleta (8:00 h), se apresentavam nos estádios de Bin, Mcl e Mcll e, após o término do tempo de cultivo, se apresentavam no estágio Bx. Foram medidos o diâmetro de embriões no momento da coleta (8:00 h), no término do tempo de manipulação (12:00 h) e no término do tempo de cultivo (22:00 h). Após a realização das medições, foram calculados as médias e desvios-padrão de acordo com o fator de correção apropriado para o aumento determinado (Hoffmann, 1987).

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran) e, posteriormente, à análise de variância. Quando apresentada significância, foi realizado o teste de comparação de médias de Duncan. Quando não atendidas as premissas de Normalidade e Homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas,

os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal Wallis (Saeg, 1999).

### **Resultados e Discussão**

De acordo com Duque et al. (2003), a melhor forma de avaliar a qualidade embrionária está na transferência dos embriões para receptoras e na verificação do estabelecimento de gestações. Entretanto, alguns testes podem prever parcialmente a qualidade embrionária, como o número total de células, diâmetro de blastocistos, alterações do metabolismo celular, coloração dos blastômeros, cinética do desenvolvimento, modificações ultraestruturais e/ou integridade de membrana celular. O número total de células embrionárias tem sido extensivamente utilizado como um indicador de qualidade de embriões em algumas espécies como suínos (Papaioannou & Ebert, 1988), bovinos (Khurana & Niemann, 2000; Lequarre et al., 2003; Pereira et al., 2005) e camundongos (Bowman & McLaren, 1970; Smith & McLaren, 1977) e, é claramente influenciado pelo ambiente de desenvolvimento no qual está inserido (Knijn et al., 2003).

No presente estudo, o número total de células foi similar entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). As médias e desvios-padrão da contagem do número de células para os diferentes tratamentos foram: Controle =  $54,1 \pm 10,7\%$ ; MD1 =  $55,5 \pm 11,4$  e MD2 =  $53,2 \pm 9,6$  (Tabela 1). Estes resultados indicam que o MD1 e o MD2 não interferem na taxa de clivagem e na qualidade de embriões após quatro horas de manutenção.

Os valores dos números de células descritos neste estudo estão muito próximos daqueles encontrados na literatura. Dentre os inúmeros experimentos

realizados com embriões de camundongas, a partir da avaliação das taxas de clivagem, foi observado por Bowman & McLaren (1970) e Smith & McLaren (1977) médias de  $56,9 \pm 7,81$  e  $44,8 \pm 3,2$  células respectivamente, em embriões produzidos *in vivo*. Entretanto, Smith & McLaren (1977) e Alexandre (1978) verificaram médias de  $48,9 \pm 1,5$ ;  $46,6 \pm 2,7$  células, respectivamente, em embriões de camundongas produzidos *in vitro*. Adicionalmente, Evsikov (1996), observou média de  $60,5 \pm 1,4$  células em embriões de camundongas produzidos *in vitro*.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão do número total de células em embriões no estágio de Bx após manutenção em meio de manipulação e posterior cultivo *in vitro*, nos diferentes tratamentos.

<b>Tratamentos</b>	<b>Total de embriões (N)</b>	<b>X±DP</b>
Controle	35	54,1±10,7
MD1	35	55,5±11,4
MD2	35	53,2±9,6

Controle: PBS modificado (Whittingham, 1971); X=média; DP=desvio padrão. As diferenças não foram significativas ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de comparação de médias Duncan.

Quanto ao diâmetro embrionário (morfometria), não foi observado diferença ( $P>0,05$ ) entre tratamentos em embriões Bin, Mcl e McII, após manutenção no meio de manipulação por quatro horas e posterior cultivo *in vitro* ( $96,7 \pm 10,5$ ;  $97,4 \pm 10,8$  e  $97,7 \pm 9,3$  micras para os tratamentos Controle, MD1 e MD2, respectivamente) (Tabelas 2, 3 e 4). Entretanto, os embriões Bin mantidos no meio MD2 se desenvolveram ( $P<0,05$ ) durante as quatro horas de manutenção ( $74,4 \pm 7,0$ ;  $76,5 \pm 7,7$  e  $78,9 \pm 7,3$  micras para os tratamentos Controle, MD1 e MD2, respectivamente), indicando que, mesmo em condições inadequadas de atmosfera (meio ambiente), o MD2 foi favorável para o desenvolvimento embrionário de blastocistos. Esta condição não foi observada em embriões Mcl e McII, tendo em vista que o diâmetro destas estruturas não

aumenta, mesmo com o desenvolvimento embrionário. Por outro lado, blastocistos aumentam de diâmetro com o desenvolvimento, até a fase de eclosão.

Tabela 2. Diâmetro de embriões (Bin) após a coleta, manutenção em meio de manipulação e posterior cultivo *in vitro*, nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Diâmetro (micra)		
	Coleta (0 h) X±DP	Manutenção (4 h) X±DP	Cultivo (10 h) X±DP
Controle	73,7±7,8 <sup>a</sup>	74,4±7,0 <sup>a,A</sup>	96,7±10,5 <sup>b</sup>
MD1	74,4±8,3 <sup>a</sup>	76,5±7,7 <sup>a,A,B</sup>	97,4±10,8 <sup>b</sup>
MD2	74,7±7,2 <sup>a</sup>	78,9±7,3 <sup>a,B</sup>	97,7±9,3 <sup>b</sup>

Controle: PBS modificado (Whittingham, 1971). X=média; DP=desvio padrão

<sup>a,b</sup>Médias com letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferença (P<0,05) entre tratamentos pelo teste de comparação de médias de Tuckey.

<sup>A,B</sup>Médias com letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença (P<0,05) entre tratamentos pelo teste de comparação de médias de Tuckey.

Tabela 3. Diâmetro de embriões (Mcl) após a coleta, manutenção em meio de manipulação e posterior cultivo *in vitro*, nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Diâmetro (micra)		
	Coleta (0 h) X±DP	Manutenção (4 h) X±DP	Cultivo (10 h) X±DP
Controle	71,7±4,6 <sup>A</sup>	71,3±5,0 <sup>A</sup>	90,2±8,9 <sup>B</sup>
MD1	71,7±5,4 <sup>a</sup>	73,0±6,7 <sup>a</sup>	91,2±8,3 <sup>b</sup>
MD2	71,3±5,0 <sup>a</sup>	73,7±5,9 <sup>a</sup>	92,6±6,9 <sup>b</sup>

Controle: PBS modificado (Whittingham, 1971).

<sup>a,b</sup>Médias com letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferença (P<0,05) entre tratamentos pelo teste de comparação de médias de Tuckey.

<sup>A,B</sup>Médias com letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferença (P<0,05) entre tratamentos pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

X=média; DP=desvio padrão.

Tabela 4. Diâmetro de embriões (MclI) após a coleta, manutenção em meio de manipulação e posterior cultivo *in vitro*, nos diferentes tratamentos.

	Diâmetro (micra)		
	Coleta (0 h)	Manutenção (4	Cultivo (10

Tratamentos	h)		h)
	X±DP	X±DP	X±DP
Controle	71,0±6,1 <sup>A</sup>	71,7±5,4 <sup>A</sup>	84,0±10,5 <sup>B</sup>
MD1	71,0±5,3 <sup>A</sup>	73,0±6,1 <sup>A</sup>	86,4±10,0 <sup>B</sup>
MD2	71,7±5,4 <sup>A</sup>	72,0±5,0 <sup>A</sup>	86,1±9,4 <sup>B</sup>

Controle: PBS modificado (Whittingham, 1971).

<sup>A,B</sup>Médias com letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferença (P<0,05) entre tratamentos pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

X=média; DP=desvio padrão.

De acordo com Dickson (1966), o diâmetro do embrião está intimamente relacionado com o desenvolvimento embrionário. Assim, o desenvolvimento do blastocisto não ocorre exatamente da mesma forma para todos os embriões, existindo uma variação no tempo de desenvolvimento e seu diâmetro (Chung, 1973).

No presente estudo, o diâmetro apresentado pelos embriões Bin, Mcl e Mcll no momento da coleta e após o término do tempo de manipulação e do tempo cultivo *in vitro* estão dentro da normalidade segundo Bowman & McLaren (1970) e Chung (1973). Lindner & Wright (1983), trabalhando com embriões bovino, verificou que o diâmetro do embrião é praticamente o mesmo durante os estádios de Mc e Bl, o aumento só ocorre no estágio de Bx, onde o diâmetro é aumentado consideravelmente (1,2 a 1,5 vezes) e a zona pelúcida é diminuída em 1/3 de sua espessura inicial.

Entretanto, não se pode descartar a possível influência dos meios de manipulação sobre os embriões. Provavelmente, a interação dos substratos energéticos (glicose, piruvato e lactato) presentes no MD2, pode ter sido determinante para o maior desenvolvimento de Bin, oferecendo as melhores condições de manutenção, suprimindo todos os requerimentos energéticos necessários.

O embrião tem maior predileção ao piruvato e lactato nas fases iniciais de desenvolvimento embrionário, enquanto a glicose é incorporada nas fases finais de desenvolvimento (Bavister, 1995; Thompson, 2000). De acordo com Gardner & Leese (1986), o piruvato é utilizado pelos embriões ao longo de seu desenvolvimento, com um aumento de suas necessidades após a blastulação, sendo esse aumento essencial para a viabilidade do blastocisto (Dorland et al., 1992). Rieger (1992) e Martin & Leese (1995) mostraram que do piruvato captado pelo embrião, 44% são metabolizados no estágio de duas células e 17% pela mórula, quando a glicose passa a ser o substrato predominantemente utilizado, enquanto que em fases anteriores do desenvolvimento, o consumo de glicose é mínimo. O blastocisto utiliza apenas 29% do piruvato captado, enquanto nessa etapa, 44% da glicose captada é convertida em lactato (Gardner & Leese, 1990). A taxa entre piruvato e lactato é essencial para o balanço do potencial oxidação/ redução (Morales et al., 1999).

A glicose, por sua vez, contribui com apenas 17% da produção de ATP produzido pelo embrião, enquanto a oxidação do piruvato é responsável por 40% do ATP produzido (Houghton & Leese, 2004). A captação e utilização de glicose é vital para a sobrevivência e desenvolvimento do embrião durante o período de pré-implantação. Esse período se estende desde a fertilização até o estágio de blastocisto, sendo que o decréscimo na captação de glicose durante esse estágio pode comprometer o desenvolvimento embrionário (Riley & Moley, 2006).

Segundo Bavister (1995), a síntese de lactato é detectada desde o estágio de uma célula até blastocisto, sugerindo que o embrião possui, desde o estágio inicial, a maquinaria completa de enzimas glicolíticas. O metabolismo

de glicose em fases embrionárias iniciais está relacionado à síntese de uma ou mais enzimas glicolíticas pelo genoma do embrião, que é ativado na fase de blastocisto. A glicólise é funcional na fase de blastocisto quando há uma demanda de energia necessária pra a compactação, expansão e formação de blastocele. A utilização dessa via de produção de energia pelo embrião pode ser um reflexo de estresse metabólico ou de longo tempo submetido a condições subótimas (Khurana & Niemann, 2000).

### **Conclusões**

Conclui-se que os meios de manipulação elaborados (MD1 e MD2) não interferem na taxa de clivagem embrionária, podendo ser utilizados em substituição a solução PBS modificado. Quanto à morfometria, conclui-se, que o MD2 favorece o maior desenvolvimento de Bin após o período de manutenção de quatro horas.

### **Agradecimentos**

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À Germovet por ceder equipamentos e materiais para a realização deste estudo.

### **Literatura Citada**

- Alexandre, H. Correlation between cytological and morphogenetic effects of acute X-irradiation of preimplantation mouse embryos cultured *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.53, p.399-402, 1978.
- Bavister, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, n.2, p.91-148, 1995.
- Bowman, P.; McLaren, A. Cleavage rate of mouse embryos *in vivo* and *in vitro*. **Journal Embryology Experimental Morphology**, vol.24, n.1, p.203-207, 1970.

- Costa, E.P.; Vale Filho, V.R.; Nogueira, J.C. et al. Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos em diferentes sistemas: I – efeito na maturação nuclear. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.5, p.551-559, 1997.
- Chung, S.O. Volume changes during the preimplantation stages of mouse egg development. **Yonsei Medical Journal**. v.14, p.63-90, 1973.
- Dickson, A.D. The form of the mouse blastocyst. **Journal of Anatomy**, v.100, n.2, p.335-348, 1966.
- Dorland, M.; Kruij, T.A.M.; Van Der Donk, J.A. Assessing day 7 bovine embryo viability by measuring the rate of nutrient uptake. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.9, n.27, p.40, 1992.
- Duque, P.; Gomez, E.; Diaz, E. et al. Use of two replacements of serum during bovine embryo culture *in vitro*. **Theriogenology**, v.50, p.889-899, 2003.
- Enright, B.P.; Lonergan, P.; Dinnyes, A. et al. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs. *in vivo*: implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, v.54, p.659-673, 2000.
- Evsikov, S.V.; Vagyna, I.N.; Solomko, A.P. Mechanisms of cell number regulation in the peri-implantation mouse blastocyst. **The Journal of Experimental Zoology**, v.276, p.201-208, 1996.
- Fukui, Y.; Ono, H. Effects of sera, hormones and granulose cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.86, p.501-506, 1989.
- Gardner, D.K.; Leese, H.J. Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation mouse embryos. **Human Reproduction**, v.1, n.1, p. 25-27, 1986.
- Gardner, D.K.; Leese, H.J. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. **Journal Reproduction and Fertility Development**, v.88, n.1, p.361-368, 1990.
- Gordon, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. CAB International, n.11. Cambridge, UK: University Press, 640p. 1994.
- Greve, T.; Avery, B.; Callenssen, H. Viability of *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. **Reproduction of Domestic Animals**, v.28, p.164-169, 1993.
- Hoelker, M.; Schmoll, F.; Schneider, H. et al. Bovine blastocyst diameter as a morphological tool to predict embryo cell counts, embryo sex, hatching ability and developmental characteristics after transfer to recipients. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p.551-557, 2006.
- Hoffmann, R.P. **Diagnóstico de Parasitismo Veterinário**. Porto Alegre: Sulina. 156p. 1987.
- Houghton, F.D.; Leese, H.J. Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.115, p.S92- S96, 2004.
- Khurana, N.K.; Niemann, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v.54, p.741-756, 2000.

- Knijn, H.M.; Gjørret, J.O.; Vos, L.A.M.P. et al. Consequences of *in vivo* development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1371-1378, 2003.
- Lane, M.; Gardner, D.K. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes *in vitro*. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.14, p.398-403, 1997.
- Lequarre, A.S.; Marchandise, J.; Moreau, B. et al. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1707-1713, 2003.
- Lindner, G.M.; Wright Jr., R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, Los Altos, v.20, p.407-416, 1983.
- Martin, K.L.; Leese, H.J. Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v.40, n.4, p.436-443, 1995.
- Morales, H.; Tilquin, P.; REES, J.F. et al. Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.52, n.2, p.149-157, 1999.
- Mori, M.; Otoi, T.; Suzuki, T. Correlation between the cell number and diameter in bovine embryos produced in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, p.181-184, 2002.
- Papaioannou, V.E.; Ebert, K.M. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst in vivo and in vitro. **Development**, v.102, n.4, p.793-803, 1988.
- Pereira, D.C.; dode, M.A.N.; Rumpf, R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.63, p. 1131-1141, 2005.
- Rafferty, Jr., K.A. **Methods in experimental embryology of the mouse**. Baltimore: The Johns Hopkins Press, 78p. 1970.
- Rieger, D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenology**, v.37, n.1, p.75-93, 1992.
- Riley, J.K.; Moley, K.H. Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. **Reproduction**, v.131, n.5, p.823-835, 2006.
- SISTEMA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA E GENÉTICA (SAEG). **Manual do usuário**. Versão 8.0. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Central de Processamento de Dados, 138p. 1999.
- Smith, R.; McLaren, A. Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele. **Journal Embryology Experimental Morphology**, 41, p.79-92, 1977.
- SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (IETS). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3ªed. Champaign, Illinois: International Embryo Transfer Society, 1998. 180p.

- Thompson, J.G. Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p.341-354, 1997.
- Thompson, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, n.2, p.263-275, 2000.
- Vanroose, G.; Van Soom, A.; De Kruif, A. From co-culture to defined medium: State of the art and practical considerations. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36, n.1, p.25-28, 2001.
- Van Soom, A.; Boerjan, M.L.; Ysebaert, M.T. et al. Cell location to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.171-182, 1996.
- Viuff, D.; Hendriksen, P.J.M.; Vos, P. et al. Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in *in vivo*-developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation. **Biology of Reproduction**, v.65, p.204–208, 2001.
- Whittingham, D.G. Culture of mouse ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.48, Suppl.14, p.7-21, 1971.
- Whittingham D.G. Embryo banks in the future of developmental genetics. **Genetics**, v.78, n.1, p.395-342, 1974.

## CAPÍTULO 4

### Diferentes meios de manipulação e sua influência na taxa de gestação de receptoras de embriões bovino

Flávio Guiselli Lopes<sup>1</sup>; Eduardo Paulino da Costa<sup>2</sup>; Carlos Antônio de Carvalho Fernandes<sup>4</sup>; Emílio César Martins Pereira<sup>3</sup>; Eduardo Ramos de Oliveira<sup>4</sup>; Aurea Helena Assis da Costa<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Doutorando - DVT - UFV

<sup>2</sup> Professor Associado - DVT - Universidade Federal de Viçosa. [epcosta@ufv.br](mailto:epcosta@ufv.br)

<sup>3</sup> Mestrando - DVT - UFV

<sup>4</sup> Biotran – Biotecnologia e Treinamento em Reprodução Animal

<sup>5</sup> Germovet – Biotecnologia em Reprodução Animal

**Resumo** - O objetivo deste trabalho foi substituir as soluções de manipulação de embriões bovino em uso na rotina de TE por meios mais simples e estáveis e, que possam ser armazenadas em temperatura ambiente. Foram testados dois meios de manipulação utilizados para coleta e manipulação de embriões, MD1 e MD2 e como controle o PBS modificado, usualmente empregado nas rotinas de TE nas diferentes espécies animais. A transferência dos embriões foi realizada a fresco, ou seja, os embriões coletados de uma determinada doadora foram inovulados no período máximo de quatro horas nas receptoras. Foram coletados e transferidos apenas os embriões de qualidade I e II foram inovulados. Foram utilizados 58 receptoras

de embriões, distribuídas aleatoriamente em três tratamentos: T1 – PBS modificado (Controle); T2 (MD1) e T3 (MD2). As taxas de gestação observadas foram: Controle = 47,4% (9/19); MD1 = 47,4% (9/19) e MD2 = 55,0% (11/20). Estes resultados demonstram que o uso de diferentes meios de manipulação não influenciou nas taxas de gestação ( $P>0,05$ ). Deste modo, conclui-se que os meios de manipulação MD1 e MD2 podem ser utilizados nas rotinas de TE, em substituição a solução PBS modificado.

Palavras-Chave: avaliação, embrião, reprodução

*Influence of different manipulation medias on pregnancy rate of embryo recipient cows*

**Abstract** - This work aimed substitutes the usually used manipulation solutions of bovine embryos on ET routines for more simple and stable medias which could be stored at room temperature. It was tested three different manipulation medias, which were used to recovery and manipulation of the embryos. The control treatment used was the modified PBS, usually used in ET routines in different animal species. The embryos were transferred freshly, i.e., they were recovered from a identified donor and transferred within less than four hours to the recipient cow. Just embryos at quality I and II were recovered and transferred. Were used 58 recipient cows randomly assigned for one of the three treatments: T1 – modified PBS (Control); T2 (MD1) and T3 (MD2). As result we observed the following pregnancy rates: Control = 47.4% (9/19); MD1 = 47.4% (9/19) and MD2 = 55.0% (11/20), which did not differ among them ( $P>0.05$ ). Therefore, the manipulation medias MD1 and MD2 can be used on ET routines to substitute the PBS modified solution.

*Keywords:* evaluated, embryo, reproduction

## **Introdução**

Atualmente, o Brasil ocupa posição de destaque e participação expressiva na produção mundial de embriões. Os números divulgados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) mostram que nos últimos anos o Brasil foi responsável por 17,6% da produção *in vivo* e 48,46% da produção *in vitro* de embriões bovinos no mundo (Viana & Camargo, 2007).

Apesar de difundida mundialmente e de todo avanço alcançado, os resultados dos programas de transferência de embriões estão aquém de seu verdadeiro potencial. Alguns fatores, como elevada variabilidade nas respostas superovulatórias, composição da solução de manipulação, manejo de doadoras e receptoras e taxas de gestação, continuam sendo obstáculos para pesquisadores e profissionais de TE. A simplificação desta técnica e a otimização dos resultados podem proporcionar a diminuição nos custos de produção dos embriões.

Ainda que todos os fatores sejam determinantes para o sucesso dos programas de TE, a manutenção do embrião em uma solução adequada, desde a coleta até a inóculo é um aspecto importante, uma vez que pode interferir na qualidade e, conseqüentemente, na viabilidade embrionária (Bavister, 1995).

Atualmente, a solução de manipulação empregada nas rotinas de TE em bovinos têm sido o PBS modificado (Whittingham, 1971). A solução fosfatada tamponada (PBS) foi formulada por Dulbecco & Vogt em 1954 para uso em manipulação de cultivos bacterianos e, posteriormente, modificada por Whittingham em 1971, para a manipulação de embriões de camundongas. Com o sucesso obtido pelo pesquisador, poucos estudos foram realizados no

intuito de encontrar soluções mais apropriadas e estáveis para a manipulação de embriões nas diferentes espécies animais.

A solução de manipulação deve ser o menos complexo possível e estável para que, ao longo do tempo, não sofra alterações na composição, interferindo assim, na viabilidade dos embriões. O PBS modificado, por exemplo, está sujeito a eventuais mudanças na composição, como variações de pH, quando armazenado por longo período de tempo em temperatura e à luz ambiente (Gordon, 1994). Portanto, a solução deve ser armazenada em local com pouca luminosidade, em ambiente refrigerado (temperatura mínima de 4°C).

O objetivo do presente trabalho foi substituir a solução de manipulação de embriões bovinos em uso na rotina de TE por meios mais simples e estáveis e, que possam ser armazenadas em temperatura ambiente.

### **Material e Métodos**

O trabalho foi realizado na região de Alfenas - MG, Brasil, em latitude sul 21° 25' 45", longitude oeste 45° 56' 50" e altitude de 882 metros, utilizando a rotina de transferência de embriões (TE) em bovinos da empresa Biotran<sup>®</sup>, no período de novembro de 2008 a fevereiro de 2009.

Foram utilizados 58 novilhas mestiças como receptoras de embriões, com peso corporal superior a 350 kg e escore corporal superior ou igual a três, numa escala de zero a cinco (Ferreira, 1990). Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em piquetes de capim *Brachiaria brizantha*, com suplementação mineral e água *ad libitum*. As receptoras foram previamente avaliadas por meio de exame ginecológico (palpação via transretal e vaginoscopia) e duas manifestações de estro com intervalo de 21±3 dias.

Todas as novilhas que se encontravam entre os dias sete e 17 do ciclo estral, ou com corpo lúteo previamente detectado por ultra-sonografia ou palpação transretal, receberam 0,53 mg de cloprostenol sódico (Ciosin®; Schering-Plough Brasil Ltda; Brasil) por via intramuscular. O cloprostenol sódico foi administrado nas receptoras 24 horas antes da aplicação nas doadoras durante o processo de superovulação. As receptoras que manifestaram estro 24 horas antes e até 24 horas após as doadoras foram consideradas sincronizadas e aptas à transferência de embriões.

Como doadoras de embriões, foram utilizadas quatro vacas da raça Holandesa, com peso corporal acima de 500 kg. Foram selecionados animais que apresentaram ciclos estrais com intervalos regulares ( $21 \pm 3$  dias) e clinicamente normais no exame ginecológico. Os animais receberam a mesma alimentação durante todo o período experimental, visando balanço energético positivo, de acordo com o NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1996) e manutenção do escore corporal de três ou quatro, numa escala de zero a cinco, segundo Ferreira (1990). Os animais foram mantidos em piquetes de capim *Brachiaria brizantha*, na presença de um rufião, com suplementação mineral e água *ad libitum*. A condição adotada para se considerar o animal em estro foi o reflexo de imobilidade à monta.

O tratamento das doadoras iniciou em dias pré-determinados, com a aplicação de um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®; Pfizer Saúde Animal; Brasil) e, no dia seguinte, com a administração de 3 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE®; Syntex S.A.; Argentina), via intra-muscular, para induzir a regressão de um possível folículo dominante e dar início ao crescimento de uma nova onda folicular.

Após cinco dias da aplicação do dispositivo de progesterona, foi dado início ao protocolo de superovulação, com a administração de doses decrescentes do hormônio FSH-p (Folltropin-V®; Vetrepharm Inc.; Canadá), via intra-muscular, a intervalos de 12 horas, perfazendo um total de oito aplicações (concentração total de 140 a 200 UI). Juntamente com a sétima aplicação foi realizada a aplicação de 0,53 mg de cloprostenol sódico (Ciosin®; Schering-Plough Brasil Ltda; Brasil) para induzir a luteólise e, concomitante com a oitava aplicação foi realizado a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona. Após a detecção do estro, foram realizadas duas inseminações, a primeira entre 10 e 12 horas e a segunda entre 20 a 24 horas após o início do estro.

Os embriões foram colhidos pelo método não cirúrgico, entre o sexto e o oitavo dia após o início do estro das doadoras. Para a lavagem de dos cornos uterinos foi utilizado o meio de manipulação, previamente equilibrado (37°C). Em seguida, no laboratório da própria fazenda, os embriões foram rastreados com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus Optical®, modelo SZH-ILLB), sob aumento de 15X e, uma vez classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e à qualidade embrionária (Iets, 1998), foram transferidos para outra placa e mantidos no período máximo de quatro horas, no meio de manipulação, previamente equilibrado (37°C) e acrescido de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA), fração V.

Foram testados dois meios de manipulação utilizados para coleta e manipulação de embriões, MD1\* e MD2\* e como controle o PBS modificado (Whittingham, 1971), usualmente empregado nas rotinas de TE nas diferentes espécies animais. A composição do meio MD1 foi definida da seguinte maneira:

---

\* Patente solicitada.

\*

Cloreto de Sódio ( $0,1027 \text{ mol L}^{-1}$ ); Cloreto de Potássio ( $0,0040 \text{ mol L}^{-1}$ ); Cloreto de Cálcio ( $0,0018 \text{ mol L}^{-1}$ ); Lactato de Sódio ( $0,0277 \text{ mol L}^{-1}$ ). O MD2 foi elaborado com a mesma formulação do MD1, acrescido de  $0,0003 \text{ mol L}^{-1}$  de Piruvato de Sódio. A solução de manipulação controle foi formulada primeiramente por Dulbecco & Vogt em 1954 e, posteriormente, modificado por Whittingham em 1971.

Os meios MD1 e MD2 foram produzidos e ajustados com glicose para  $290 \text{ mOsm}$ , com o auxílio de um osmômetro (Osmette A<sup>®</sup> Automatic Osmometer) e o pH ajustado para 7,2 a 7,4. Todos os reagentes utilizados para a produção dos meios de manipulação e de cultivo foram testados para cultivo celular. Além disso, os antibióticos utilizados para os meios MD1 e MD2 foram os mesmos utilizados no PBS modificado.

A transferência dos embriões foi realizada a fresco, ou seja, os embriões coletados de uma determinada doadora foram inovulados no período máximo de quatro horas nas receptoras. Foram coletados e transferidos apenas os embriões de qualidade I e II. As receptoras de embrião foram distribuídas aleatoriamente em três tratamentos: T1 – PBS modificado (Controle); T2 (MD1) e T3 (MD2). A inovulação dos embriões foi realizada pelo método transcervical (não cirúrgico), depositando o embrião no útero da receptora. As inovulações foram realizadas no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário com corpo lúteo, previamente detectado por palpação transretal.

O diagnóstico de gestação foi realizado no 28º dia após a detecção do estro das receptoras, por meio de exame ultra-sonográfico (Pie Medical<sup>®</sup>; modelo Scanner 100 Falco), acoplado a um transdutor para avaliação endo-retal bifrequencial 6/8 MHz. Para análise estatística da taxa de gestação, os

dados foram comparados em tabela de contingência e analisada pelo teste de qui-quadrado, a 5% de probabilidade (Sampaio, 2002).

### Resultados e Discussão

As taxas de gestação observadas em receptoras de embriões de cada tratamento foram: Controle = 47,4% (9/19); MD1 = 47,4% (9/19) e MD2 = 55,0% (11/20). Estes resultados demonstram que o uso de diferentes meios de manipulação não influenciou nas taxas de gestação ( $P>0,05$ ) conforme se verifica na Tabela 1.

Tabela 1. Taxas de gestação em receptoras bovina inovuladas com embriões a fresco, nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	N	Gestantes (N)	Gestação (%)
Controle	19	9	47,4 <sup>a</sup>
MD1	19	9	47,4 <sup>a</sup>
MD2	20	11	55,0 <sup>a</sup>

Controle: PBS modificado (Whittingham, 1971).

Não houve diferença entre tratamentos ( $P>0,05$ ), pelo teste do Qui-quadrado.

N = número de animais;

As taxas de gestação obtidas neste experimento estão próximas àquelas observadas por vários pesquisadores, utilizando o PBS modificado (Whittingham, 1971) como solução de manipulação de embriões bovina. Macmillan (1998) estudando resultados da literatura de transferência de embriões bovino a fresco, verificou média de 43% de gestações, com variações de 31 a 60%. Em concordância com estes achados, Fernandes (1999), observou variações de 58,76% a 31,03% nas gestações. Adicionalmente, Coelho (1986); Elington et al. (1991); Fernandes & Viana (1996) e Viana (1996) verificaram média de 55% de gestação em embriões viáveis.

Resultados semelhantes foram encontrados por Gioso (2005) e Hass (2007) onde verificaram taxas de gestação de 45,5% (10/22) e 50% (11/22), respectivamente e, superior ao reportado por Marques (2006), que observou taxa de gestação de 32,5% (25/77) utilizando as atividades de campo da empresa Biotran®.

### **Conclusões**

Conclui-se que os meios elaborados (MD1 e MD2) podem ser utilizados como soluções de manipulação de embriões, em substituição ao PBS modificado. Estes dois meios não comprometem a capacidade de desenvolvimento dos embriões, avaliada pela taxa de gestação. Adicionalmente, possuem a vantagem de serem meios estáveis e não necessitarem de refrigeração no acondicionamento.

### **Agradecimentos**

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À Biotran por ceder os animais, materiais equipamentos para a realização deste estudo.

À Germovet por ceder equipamentos e materiais para a realização deste estudo.

### **Literatura Citada**

- Bavister, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, n.2, p.91-148, 1995.
- Coelho, E.N. **Alguns aspectos da transferência de embriões em bovinos**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 1986. 83p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1986.

- Ellington, J.E.; Foote, R.H.; Farrell, P.B.; et al. Pregnancy rates after the use of a gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo recipients. **Theriogenology**, v.36, p.1035-1042, 1991.
- Fernandes, C.A.C., Viana, J.H.M. Efeito da qualidade de embriões de vacas da raça Limousin sobre a taxa de gestação de receptoras. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 10, Águas de Lindóia, **Resumo...** Águas de Lindóia: SBTE, p.99. 1996.
- Fernandes, C.A.C. Inoculações não cirúrgicas e taxa de gestação de receptoras de embrião. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.3, p.263-266, 1999.
- Ferreira, A.M. **Efeito da amamentação e do nível nutricional na atividade ovariana de vacas mestiças leiteiras**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1990. 134p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1990.
- Gioso, M.M.; Costa, E.P.; Fernandes, C.A.C.; et al. Perfil de progesterona e intervalo ao estro de receptoras bovinas sincronizadas com doses reduzidas de cloprostenol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.4, p.1181-1187, 2005.
- Gordon, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. CAB International, n.11. Cambridge, UK: University Press, 640p. 1994.
- Haas, G.T.S.; Fernandes, C.A.C.F.; Costa, E.P.; Torres, C.A.A.; Marques, P.A.F.; Lopes, F.G.; Paula, T.A.R. Taxa de prenhez e concentração sérica de progesterona em novilhas receptoras de embrião tratadas com somatotropina recombinante bovina (rbST). **Ceres**, v.54, n.311, p.26-32, 2007.
- Macmillan, W.H. Statistical models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer. **Theriogenology**, v.50, p.1053-1070, 1998.
- Marques, P.A.F. **Influência da somatotropina recombinante bovina (rbST) aplicada em receptoras de embriões bovinos, no dia do estro, sobre variáveis reprodutivas**. Viçosa: Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, 2006. 52p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of beef cattle**. 7<sup>a</sup>ed. Washington, D.C. 42p. 1996.
- Sampaio, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 2<sup>a</sup>ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 265p. 2002.
- SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (IETS). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3<sup>a</sup>ed. Champaign, Illinois: International Embryo Transfer Society, 1998. 180p.
- Viana, J.H.M. **Avaliação ultra-sonográfica de estruturas ovarianas em doadoras e receptoras de embrião**. Viçosa: Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, 1996. 120p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.

- Viana, J.H.M.; Camargo, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, n.3, p.915-924, 2007.
- Whittingham, D.G. Culture of mouse ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.48, Suppl.14, p.7-21, 1971.

## CAPÍTULO 5

### **Nova técnica para contagem do número de células de blastocistos**

*A new technique to count the number of cells of blastocysts*

Eduardo Paulino da Costa<sup>1</sup>; Flávio Guiselli Lopes<sup>2</sup>; Emílio César Martins Pereira<sup>3</sup>; Vanessa Lopes Dias Queiroz<sup>4</sup>; José Rogério Moura Almeida Neto<sup>2</sup>; Gustavo Guerino Macedo<sup>2</sup>; Aurea Helena Assis da Costa<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Professor Associado - DVT - Universidade Federal de Viçosa. [epcosta@ufv.br](mailto:epcosta@ufv.br)

<sup>2</sup> Doutorandos - DVT - UFV

<sup>3</sup> Mestrando - DVT - UFV

<sup>4</sup> Graduando - DVT - UFV

<sup>5</sup> GERMOVET – Biotecnologia em Reprodução Animal

**Resumo** - O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica simplificada e eficiente para contagem do número total de células de blastocistos. Foram coletados embriões de camundongas utilizando a solução de PBS descrita por (Dulbecco & Vogt, 1954) modificada por (Whittingham, 1971). Posteriormente, estes embriões foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e quanto à qualidade embrionária, sendo selecionados para o cultivo apenas embriões nos estádios de blastocisto inicial (Bin), mórula compacta grau I (Mcl) e II (McII). O cultivo foi realizado em meio TCM 199 modificado, previamente equilibrado (37°C), em atmosfera de 5% de dióxido de carbono, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora. Após o término do tempo de cultivo de 10 horas, os embriões foram transferidos e lavados novamente em meio Talp-Hepes modificado, previamente equilibrado (37°C), sendo classificados quanto ao estágio de

desenvolvimento e quanto à qualidade embrionária. Depois de classificados, foram selecionados 195 embriões viáveis no estágio de blastocisto para serem processados para contagem do número de células de acordo com a técnica proposta. A técnica mostrou-se rápida e efetiva para contagem de células, permitindo fácil visualização até em microscópio estereoscópio.

Palavras-Chave: Célula, embrião, reprodução

**Abstract** - The aim of this study was develop a simplified and efficient technique to count the total number of cells of blastocyst in mice. The embryos were recovered from mice using a PBS solution described by Dulbecco & Vogt (1954) modified by Whittingham (1971). Embryos were classified as development stage and quality, being selected for culture just embryos on early blastocyst (Bin), compact morula grade I (Mcl) and II (McII) stage. Embryos were washed in modified Talp-Hepes equilibrated previously (37°C), transferred and cultured in modified TCM 199 equilibrated previously (37°) in 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub> and 95% of humidity in a incubator. After 10 h of culture, embryos were washed in modified Talp-Hepes, equilibrated previously (37°), being classified according their development stage and quality. After classified, were selected 195 viable embryos on blastocyst stage to be processed for counting the number of cells according the proposed technique. The new technique show to be quick and efficient to count cells, allowing easy visualization on stereoscopic microscopy.

**Keywords:** Cell, embryo, reproduction

### Introdução

O aprimoramento das técnicas envolvidas no processo de cultivo *in vitro* de embriões têm sido de fundamental importância para o estudo e a compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário.

A contagem do número total de células tem sido utilizada como um importante parâmetro para avaliação da qualidade de embriões (Bowman e McLaren, 1970; Chung, 1973; Whittingham, 1974; Thompson, 1997; Enright et

al., 2000 e Viuff et al., 2001). O desenvolvimento fetal normal é dependente do número de células totais do embrião e o estabelecimento de uma proporção adequada entre MCI:TF é considerada essencial para assegurar a viabilidade embrionária (Lane e Gardner, 1997).

Segundo Avelino (2004), o número de células nos blastocistos produzidos *in vitro* pode ser menor do que o encontrado em embriões produzidos *in vivo*. Em relação aos métodos utilizados para a contagem ou avaliação morfológica de células, a escolha do método de coloração depende do tipo de células e dos objetivos específicos de cada trabalho. O método de coloração de embriões utilizando o corante DNA específico Hoeschst 33342 foi descrito por Handyside e Hunter (1984) e Pursel et al. (1985) e utilizado mais tarde por Ellington et al. (1990) trabalhando com embriões bovinos e murinos (Li et al., 2005; Warger II et al., 2008) e em ovinos por Smith e Wilmut (1989). Este método de coloração envolve a utilização do corante Hoeschst 33342 e a visualização em microscopia de fluorescência após fixação em lâmina e lamínula (Almodin et al., 1999). Tarin et al. (2002), por sua vez, descreveu a possibilidade de utilização de dois corantes, o iodeto de propídeo e o Hoeschst 33342 sucessivamente. Além disso, métodos mais simplificados e de custo baixo também são utilizados, como a coloração de Giemsa em embriões de camundongas (Alexandre, 1978; Hishinuma et al., 1996; Evsikov et al., 1996).

O método de contagem de células proposto por Lim et al. (1994), foi baseado na metodologia utilizada para preparação de cromossomos de zigotos e blastócitos bovinos, descrita inicialmente por King et al. (1979) citado por Lim et al. (1994), com algumas modificações. Neste estudo, embriões bovinos são mantidos em solução de citrato de sódio 0,9% em temperatura de 20 a 25°C, por 15 minutos. Após o término do tempo, os embriões são passados rapidamente (60 a 90 segundos) em solução de fixação aceto-álcool e, então, transferidos para as lâminas. A solução fixadora é composta de metanol, ácido acético e água destilada na proporção 3:2:1, em temperatura de 4°C. Após a secagem das lâminas, durante 30 minutos em temperatura ambiente, as mesmas são coradas por 15 a 20 minutos com solução Giemsa 10%. Em seguida, o corante é removido com água destilada e as células contadas em microscópio invertido.

O método de contagem de células proposto por Fukui e Ono (1989), foi baseado na metodologia descrita por Ushijima et al. (1988) citado por Fukui e Ono (1989). Primeiramente, os embriões são colocados em solução de citrato de sódio 0,9% em temperatura ambiente, por 10 a 20 minutos. Após o término do tempo, os embriões são mantidos por 1 minuto em solução de fixação e então fixados em lâmina, depositando um pequeno volume de fixador. A solução fixadora é composta de álcool, ácido acético e água destilada na proporção 3:2:1, em temperatura de 4°C. Após a secagem das lâminas, durante 1 hora em temperatura ambiente, as mesmas são coradas por 15 minutos com solução Giemsa 10%. Posteriormente, o corante é removido com água destilada e as células contadas em microscópio de contraste de fase.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica simplificada e eficiente para contagem do número total de células de embriões de camundongas.

### **Materiais e Métodos**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal – DVT/UFV, utilizando embriões de camundongas da espécie *Mus musculus*, da linhagem Suíça-Albina, provenientes do Biotério Central – CCB/UFV, no período de janeiro de 2008 a fevereiro de 2009.

A partir do protocolo de superovulação convencional (Rafferty, 1970), as fêmeas doadoras de embriões foram induzidas a superovulação mediante a administração de 10 UI (0,1 mL) de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) (Novormon®; Syntex SA; Argentina), via intra-peritoneal, seguida da administração de 10 UI (0,1 mL) de gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Vetecor®; Calier S.A.; Espanha), via intra-peritoneal, 48 horas após. Depois da administração do hCG, as fêmeas foram colocadas em gaiolas individuais para o acasalamento, na proporção de duas fêmeas para cada macho, por 24 horas.

Após 60 a 80 horas do acasalamento, as fêmeas doadoras foram submetidas à eutanásia para posterior coleta dos embriões. Os aspectos éticos foram rigidamente considerados, sendo o projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, processo 10/2006, em reunião realizada no dia 26 de abril de 2006.

A coleta dos embriões foi precedida da lavagem dos cornos uterinos e útero, no sentido corno uterino – útero, por onde se perfundi o meio PBS descrito inicialmente por Dulbecco & Vogt, 1954 modificado por Whittingham, (1971), previamente equilibrado (37°C), mediante o uso de uma seringa de 3 mL acoplada a uma agulha hipodérmica (30 x 0,70 mm, 22G).

Depois de classificados, foram selecionados para o cultivo apenas embriões nos estádios de blastocisto inicial (Bin), mórula compacta grau I (Mcl) e II (McII) sendo posteriormente transferidos e cultivados em placas de quatro poços (Nunc® A/S), durante 10 horas, em meio de cultivo TCM 199 modificado (Costa et al., 1997), previamente equilibrado (37°C), em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora (Jouan®, modelo IG 150).

Após o término do tempo de cultivo, os embriões foram transferidos e lavados em placa escavada, em meio Talp-Hepes modificado (Costa et al., 1997), previamente equilibrado (37°C), sendo classificados novamente quanto ao estágio de desenvolvimento e à qualidade embrionária (lets, 1998), com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus Optical®, modelo SZ-40/SZ-ST) em ocular de 10X e objetiva de 4X. Depois de classificados, 195 embriões viáveis no estágio de blastocisto foram processados para contagem do número de células de acordo com a técnica proposta.

Para o procedimento de contagem de células foram adotadas as seguintes etapas para a execução da técnica:

- 1) As lâminas foram inicialmente preparadas sendo imersas em solução de álcool-éter (1:1) para promover a retirada de impurezas e gordura, permanecendo nesta solução até o momento do uso;
- 2) Em uma etapa posterior o fundo das lâminas de vidro foi riscado em forma de círculo com auxílio de uma ponteira de diamante, para facilitar a visualização dos embriões durante os procedimentos;
- 3) Após o término do tempo de cultivo, com auxílio de um microscópio estereoscópio em ocular de 10X e objetiva de 4X e uma micropipeta (confeccionada a partir de tubo capilar para micro-hematócrito), os embriões foram transferidos e lavados em placas escavadas, contendo

- meio Talp-Hepes modificado (Costa et al., 1997), sendo mantidos em geladeira, aguardando o processamento na etapa posterior;
- 4) Em seguida, cada embrião foi submetido separadamente em todos os procedimentos subseqüentes. Inicialmente foi transferido e mantido por 60 segundos em solução de citrato de sódio 0,88% e água destilada, na proporção 1:1, em temperatura ambiente;
  - 5) Após o término do tempo, o embrião foi transferido e mantido por 30 segundos em solução de fixação, composta de metanol: ácido acético: água destilada, na proporção 3:2:1, em temperatura de 5°C;
  - 6) Após o término do tempo, o embrião foi transferido e colocado em lâmina previamente limpa, desengordurada e enxuta;
  - 7) Depois, com o auxílio de um microscópio estereoscópio em ocular de 10X e objetiva de 4X e uma micropipeta (confeccionada de tubo capilar para micro-hematócrito) foi aspirado todo o excesso de solução de fixação, permitindo que o embrião ficasse imóvel na lâmina;
  - 8) Em seguida, a lâmina foi fixada à temperatura de 37°C, sobre placa aquecedora, por um período de 15 minutos;
  - 9) Após a fixação, a preparação foi corada com o Kit de Coloração Panótico Rápido (Instant Prov<sup>®</sup>), sendo imersa sequencialmente nos corantes números 1, 2 e 3, em intervalos de 5 segundos, respectivamente;
  - 10) Posteriormente, a lâmina foi lavada cuidadosamente em água destilada e seca ao ar;
  - 11) Imediatamente após a secagem, foi adicionado uma pequena gota de óleo de imersão (2 µL) na preparação, sendo coberta com uma lamínula (22 x 22 milímetros) e vedada as margens com esmalte;
  - 12) Posteriormente, a preparação foi acondicionada em temperatura ambiente, em caixa de acondicionamento de lâminas.
  - 13) Por fim, foi realizada a contagem do número de células utilizando um microscópio estereoscópio em ocular de 10X e objetiva de 4X ou microscópio convencional.

## **Resultados e Discussão**

No presente estudo, foram analisadas 195 lâminas confeccionadas pela técnica descrita a partir de embriões murinos previamente expostos a meios de manipulação. A técnica desenvolvida é diferente dos métodos convencionais (Fukui e Ono, 1989 e Lim et al., 1994), usualmente empregados para contagem de células embrionárias nas diferentes espécies de animais.

A técnica desenvolvida permite uma análise rápida e segura do número total de células embrionárias, fator esse, essencial para os estudos de maturação embrionária e fecundação *in vitro*. Além disso, possibilita fácil visualização de células em microscópio estereoscópio e maior tempo de permanência da qualidade de coloração em lâminas.

O tempo de confecção das lâminas é um fator determinante para o diagnóstico rápido e seguro durante os procedimentos de produção de embriões *in vitro*, principalmente quando se têm um número elevado de lâminas para serem analisadas. O método utilizando a coloração de Giemsa 10% descrito por Fukui e Ono (1989) prevê um intervalo de tempo de uma hora para secagem das lâminas após a fixação enquanto Lim et al. (1994) prevê um intervalo de 30 minutos. Entretanto, o método proposto descreve a secagem das lâminas por um período inferior, de apenas 15 minutos.

Além disso, o tempo de exposição ao corante representa outra vantagem da metodologia proposta. O tempo de permanência do corante Giemsa para coloração de lâminas de embriões foi descrito com duração aproximada de 15 minutos (Fukui e Ono 1989; Lim et al. 1994), bastante superior ao descrito nesta técnica, que é de aproximadamente 15 segundos, sendo 5 segundos em cada Panótico.

Outra vantagem da técnica proposta consiste no procedimento de visualização das células embrionárias para a realização da contagem. Enquanto técnicas exigem microscopia de contraste de fase (Fukui e Ono 1989), microscopia invertida (Lim et al., 1994) ou microscopia de luz (Hishinuma et al. 1996) para a contagem de células, no método proposto este procedimento pode ser realizado com uso de equipamento mais simples, que é o microscópio estereoscópio (40x de aumento), permitindo a perfeita visualização e individualização das células (Fig.1) para realizar o procedimento de contagem com segurança e eficiência. Esta facilidade de visualização pode

ser explicada uma vez que a utilização do Panótico para a coloração das células permite uma boa nitidez na visualização das células embrionárias.

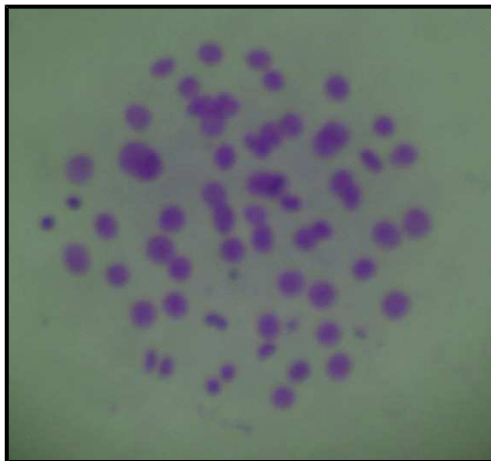


Figura 1. Número de células de um embrião no estágio inicial de Bx, utilizando a técnica descrita, sob aumento de 400X.

### **Conclusões**

A técnica desenvolvida permitiu uma análise mais rápida e efetiva para avaliação do número de células embrionárias, fator fundamental em estudos de maturação embrionária e FIV. Além disso, verificou-se a vantagem da metodologia proposta em relação à facilidade de visualização das lâminas frente à outras metodologias tradicionalmente utilizadas.

### **Agradecimentos**

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À Germovet por ceder equipamentos e materiais para a realização deste estudo.

### **Referências Bibliográficas**

**ALEXANDRE, H.** Correlation between cytological and morphogenetic effects of acute X-irradiation of preimplantation mouse embryos cultured in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.53, p.399-402, 1978.

**ALMODIN, C.G.; MORON, A.F.; JUNIOR, L.K.; KRÜGER, E.; PEREIRA, L.A.C.; MINGUETTI-CÂMARA, V.C.** Avaliação do desenvolvimento de embriões bovinos pós-biópsia: um modelo para treinamento. *RBGO* v.21, n.9, p.533-538, 1999

**AVELINO, K.B.** Estimulação e inibição da síntese de glutatona em oócitos bovinos: efeitos sobre a maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro*. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2004. 93p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2004.

**BOWMAN, P.; McLAREN, A.** Cleavage rate of mouse embryos *in vivo* and *in vitro*. *Journal Embryology Experimental Morphology*, vol.24, n.1, p.203-207, 1970.

**COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; FERREIRA, A.M.; GUIMARAES, J.D.; COSTA, A.H.A.** Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos em diferentes sistemas: I – efeito na maturação nuclear. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.49, n.5, p.551-559, 1997.

**CHUNG, S.O.** Volume changes during the preimplantation stages of mouse egg development. *Yonsei Medical Journal*, v.14, p.63-90, 1973.

**ENRIGHT, B.P.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; WARD, F.A.; YANG, X.; BOLAND, M.P.** Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs. *in vivo*: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*, v.54, p.659-673, 2000.

**ELLINGTON, J.E.; CARNEY, E.W.; FARRELL, P.B.; SIMKIN, M.E.; FOOTE, R.H.** Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biology of Reproduction*, v.43, p.97-104, 1990.

**EVSIKOV, S.V.; VAGYNA, I.N.; SOLOMKO, A.P.** Mechanisms of cell number regulation in the peri-implantation mouse blastocyst. *The Journal of Experimental Zoology*, v.276, p.201-208, 1996.

**FUKUI, Y.; ONO, H.** Effects of sera, hormones and granulose cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.86, p.501-506, 1989.

**HANDYSIDE, A.H.; HUNTER, S.** A rapid procedure for visualizing the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocysts in situ using polynucleotide-specific fluorochromes. *The Journal of Experimental Zoology*, v.231, n.3, p.429-434, 1984.

**HISHINUMA, M.; TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H.** Post-implantation development of demi-embryos induction of decidual cell reaction in mice. *Theriogenology*, v.45, n.6, p.1187-1200, 1996.

**KING, W.A.; LINARES, T.; GUSTAVSSON, I.; BANE, A.** A method for preparation of chromosomes from bovine zygotes and blastocysts. *Veterinary Research Communications*, v.3, n.1, p.51-56, 1979.

**LANE, M.; GARDNER, D.K.** Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes *in vitro*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.14, p.398-403, 1997.

**LI, X.; WEI, W.; YONG, J.; JIA, Q.; YU, Y.; DI, K.** The genetic heterozygosity and fitness of tetraploid embryos and embryonic stem cells are crucial parameters influencing survival of mice derived from embryonic stem cells by tetraploid embryo aggregation. *Reproduction*, v.130, p.53-59, 2005.

**LIM, J.M.; OKITSU, O.; OKUDA, K. NIWA, K.** Effects of fetal calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, v.41, p.1091-1098, 1994.

**PURSEL, V.G.; WALL, R.J.; REXROAD, C.E.; HAMMER, R.E.; BRINSTER, R.L.** A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology*, v.24, p.687-691, 1985.

**RAFFERTY JR, K. A.** *Methods in Experimental Embryology of the Mouse*, John Hopkins University Press, Baltimore, p. 82,1970.

**SMITH, L.C.; WILMUT, I.** Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biology of Reproduction*, v.40, p.1027-1035, 1989.

**SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (IETS).** Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3ªed. Champaign, Illinois: International Embryo Transfer Society, 1998. 180p.

**TARIN, J.J.; GOMEZ-PIQUER, V.; PEREZ-ALBALA, S.; HERMENEGILDO, C.; CANO, A.** Predictive variables of in vitro fertilization and pre-implantation embryo development in the mouse, *Molecular Reproduction and Development*, n.63, p.38-46, 2002.

**THOMPSON, J.G.** Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, v.9, p.341-354, 1997.

**USHIJIMA, H.; YAMAKAWA, H.; NAGASHIMA, H.** Cryopreservation of bovine pre-morulastage *in vitro* matured / *in vitro* fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. *Biol Reprod* 1999; 60: 534–539.

**VIUFF, D.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS, P.; DIELEMAN, S.J.; BIBBY, B.M.; GREVE, T.; HYTTEL, P.; THOMSEN, P.D.** Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in *in vivo*-developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation. *Biology of Reproduction*, v.65, p.204–208, 2001.

**WARGER II, W.C.; NEWMARK, J.A.; WARNER, C.M.; DIMARZIO, C.A.** Phase-subtraction cell-counting method for live mouse embryos beyond the eighth-cell stage. *Journal of Biomedical Optics*, v.13, n.3, p.0340051-0340058, 2008.

**WHITTINGHAM D.G.** Embryo banks in the future of developmental genetics. *Genetics*, v.78, n.1, p.395-342, 1974.

**WHITTINGHAM, D.G.** Culture of mouse ova. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.48, Suppl.14, p.7-21, 1971.

#### **4. CONCLUSÃO FINAL**

Conclui-se que os meios de manipulação MD1 e MD2 podem ser utilizados nas rotinas de TE, em substituição a solução PBS modificado.