



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

**PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES:
CULTIVO DE EMBRIÕES PÓS-ECLOSÃO
E CRIOPRESERVAÇÃO DE MEIOS
PRONTOS PARA USO**

Daniela Oliveira Brandão

Brasília
2006

DANIELA OLIVEIRA BRANDÃO

**PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES: CULTIVO DE
EMBRIÕES PÓS-ECLOSÃO E CRIOPRESERVAÇÃO
DE MEIOS PRONTOS PARA USO**

Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Celular do Instituto de Biologia da
Universidade de Brasília como um dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Biologia Molecular

Departamento: Biologia Celular

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Rumpf

Brasília

Setembro de 2006

Brandão, Daniela Oliveira

Produção in vitro de embriões: cultivo de embriões pós-eclosão e criopreservação de meios prontos para uso/ Daniela Oliveira Brandão – Brasília, 2006.

107f.

Orientador: Rodolfo Rumpf.

Tese (Doutorado). Biologia Molecular. Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília, 2006.

1. Bovino, 2. Reprodução Animal Assistida, 3. Biotecnologia, 4. Cultivo Pós-eclosão, 5. Criopreservação. I. Título

TERMO DE APROVAÇÃO

Nome: BRANDÃO, Daniela Oliveira

Título: Produção in vitro de embriões: cultivo pós-eclosão e criopreservação de meios prontos para uso

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília como um dos requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Biologia Molecular

APROVADA EM: 26 de outubro de 2006

Dra. Margot Alves Nunes Dode
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Dr. Maurício Machaim Franco
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Profa.Dra. Sônia Bão
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Rodolfo Rumpf
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia

ORIENTADOR

**Aos elementos que compõem a vida:
o homem, as coisas, os sentimentos, a sabedoria.
Muito obrigado a Deus pela perfeição de tudo!**

Ao meu querido pai, **Reinaldo Carvalho Brandão**, que se tornou veterinário junto comigo. Muito obrigada ao mais amoroso de todos os homens, que me proporcionou a vida e todas as condições para vivê-la bem.

Meu exemplo maior de dedicação, companheirismo, trabalho e educação, ensinamentos fundamentais reconhecidos em toda a minha jornada.

À querida **Lulu**, que proporcionou a mim o amor incondicional com suas atitudes constantes de doçura, força, organização, positividade e tranquilidade. Pela imensurável capacidade de doação pessoal que fizeram dela a mais zelosa das mães, e de mim, uma filha eternamente grata.

Ao meu irmão **Gilberto**, pelo incentivo animador e constante, exemplo alegre de dedicação ao conhecimento e à generosidade do saber que muito influenciaram minha formação.

A minha irmã **Patrícia**, pelo carinho, firmeza e paciência em todos os momentos, principalmente me ensinando que a renovação e recomeço fazem parte de nossas vidas.

A todos eles, dedico esta tese e agradeço pelo privilégio de conviver!

AGRADECIMENTOS

À **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia** por ter aberto aos meus olhos o maravilhoso mundo da reprodução animal assistida e suas infinitas possibilidades.

Ao **Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília** pela formação acadêmica e disponibilização do conhecimento.

Ao **Danish Institute of Agricultural Sciences**, especialmente representado nas figuras do **Dr.Gábor Vajta** e **Dr. Henrik Callesen**, pelo convite, oportunidade e empenho na realização do projeto como um todo.

Ao **Dr. Poul Maddox-Hyttel**, um mestre da microscopia de luz e eletrônica, por ter gentilmente aberto as portas da The Royal Veterinary and Agricultural University (KVL), Dinamarca, e pela imprescindível contribuição no trabalho.

Ao **Dr. Rodolfo Rumpf**, orientador deste trabalho, pelo acolhimento e ensinamentos na Embrapa nestes anos todos, pela oportunidade da formação científica, e finalmente o incentivo para busca de novos caminhos na reprodução animal.

À minha grande amiga **Margot Dode**, exemplo de dedicação à ciência e ao cientista, incansável pesquisadora e de disposição inigualável para auxiliar a qualquer estudante que enxergue na pesquisa o trabalho sério que ela envolve. Muito obrigada pela presença em toda minha formação científica e humana.

A minha grande amiga e irmã **Daniela Costa Pereira**, sempre presente em todos os momentos de minha passagem pela Embrapa, com quem dividi as experiências alegres e também as difíceis que tangem a reprodução animal dos dias de hoje.

Ao **Ivo Pivato**, um amigo inigualável e exemplo de ser humano a ser seguido, não só pelo caráter único, mas pela filosofia de vida que prova todos os dias: estamos aqui para fazer o bem, indiscriminadamente!

Aos técnicos **Anette Pedersen, Ruth Kristensen, Klaus Villemoes e Inge Lise Soresen** pela ajuda constante nos trabalhos no DIAS, os ensinamentos de técnica e pela extrema dedicação a todos os projetos que lhes cabiam responsabilidades.

A **Sra. Gunnel**, da KVL, que pacientemente me treinou para os procedimentos histológicos que permitiram o trabalho de base desta tese.

À amiga **Lílian Iguma**, que constantemente participou da minha trajetória de pesquisa, incentivando a continuidade, consolando os percalços e vibrando com todos os passos bem dados.

À amiga **Ana Sofia Lopes**, que conseguia constantemente me fazer sorrir na Dinamarca, com seus divertidos trejeitos lusitanos, seu carinho e amizade, pela troca de experiências, além da minha grande admiração pelo seu trabalho científico.

Aos amigos “embrapianos” **Tatiana Mundim, Georgia Corrêa, Fred Martins, Léo Goiano, Alexandre Floriano, Katlen, Ligiane, Rafael Dresh, Marcelo Tigre, Anísio e Graziele Marinheiro**, grandes profissionais que muito admiro e por quem guardo muito boas experiências de convívio e amizade.

A toda a **equipe do Cenargen**, muito especialmente aos profissionais **Regivaldo e Rosângela**, que sem percebermos, participam direta ou indiretamente de toda e qualquer atividade desenvolvida na instituição.

Aos profissionais exemplares da Embrapa, **Maurício Machaim, Roberto Sartori e Eduardo**, pelas ótimas conversas científicas e animadora troca de conhecimentos.

À **Ana**, da secretaria de pós-graduação da Biologia Celular, pela gentileza e compreensão nas dificuldades e ajuda nos processos administrativos do curso.

Muito especialmente agradeço à amiga **Michelle Parra**, pelo apoio constante nas horas boas e não tão boas, pelos conselhos e incentivo fundamentais em vários momentos desta trajetória.

Agradeço, enfim, a todas as pessoas que, citadas aqui ou não, contribuíram para a realização desta tese, concluída de forma muito gratificante.

RESUMO

Taxas de blastocisto aceitáveis são obtidas com os sistemas atuais de produção in vitro de embriões. Entretanto, o elevado índice de reabsorção embrionária e descontinuidade de gestação, bem como as variações dos resultados obtidos, diminuem de forma significativa a eficiência da técnica. Na tentativa de minimizar estes dois fatores focados nesta tese foram o desenvolvimento de novas formas de monitoramento dos embriões e simplificação da rotina diária. O primeiro trabalho, desenvolvido para o monitoramento do desenvolvimento embrionário, procura aprofundar o entendimento das perdas embrionárias no período de reconhecimento materno da gestação. Apesar de inúmeras investigações do desenvolvimento e caracterização embrionárias serem constantemente realizadas, estas estão restritas ao embrião até 7 dias de vida ou à gestação avançada. A maioria dos problemas, no entanto, está concentrada no período de reconhecimento materno, seguido da implantação no endométrio, sendo imprescindível a criação de métodos práticos e confiáveis que permitam o monitoramento do desenvolvimento embrionário pós-eclosão. Diante dessa necessidade, foi estabelecido um sistema de cultivo in vitro de embriões bovinos no período pós-eclosão denominado sistema PHD (post hatching development). Nele, embriões produzidos in vitro foram cultivados em túneis de gel de agarose em meio de cultivo modificado e os dados obtidos revelaram que o sistema de cultivo foi capaz de sustentar a diferenciação celular do embrião em trofoblasto, hipoblasto e epiblasto, inclusive com a formação da camada de Rauber, definindo assim o disco embrionário. Este sistema de cultivo representa o primeiro modelo experimental capaz de promover crescimento e diferenciação pós-eclosão in vitro, podendo ser utilizado com sucesso para monitorar o efeito tardio de tratamentos utilizados no sistema de cultivo. Dados preliminares de seu uso para monitorar substâncias tóxicas e expressão gênica foram obtidos e estão relacionados no corpo desta Tese. Adicionalmente ao sistema PHD, um segundo trabalho focou a simplificação e maior padronização da rotina da produção in vitro de embriões, sugerindo para isto, o congelamento e estoque de meios de cultivo prontos para uso. Os resultados obtidos com meios congelados em dois sistemas distintos de produção in vitro (DIAS-Dinamarca e Embrapa- Brasil), mostraram ser possível a produção de embriões em meios previamente congelados, sem que haja prejuízo nas taxas de blastocisto alcançadas. Além de facilitar a laboriosa rotina de produção de meios de cultivo, seu congelamento e estoque permitiram a existência de padronização entre manipulações, dado que a partida dos meios de cultivo utilizados é sempre a mesma. Em conclusão, os dois trabalhos desenvolvidos nesta Tese, um de contribuição científica e o outro aplicado, procuram contribuir em áreas pouco exploradas e deixam claro que existem lacunas a serem investigadas para melhoria dos sistemas atuais da produção in vitro de embriões.

ABSTRACT

Acceptable blastocyst rates are obtained with the actual systems of in vitro embryo production. However, the high rate of embryonic death and gestation interruption, as much as the broad variation in the obtained results, reduce significantly the technique efficiency. In a trial to minimize both factors, this thesis has focused on developing new monitoring systems and routine work simplification. The first work was developed for monitoring embryo development, in an effort to understand embryos loss in the maternal recognition of pregnancy period. Although several investigations have been focused in embryo development and characterization, these are restricted to the embryo up to 7 days, or to the late gestation. However, most of the problems are concentrated in the maternal recognition period, followed by endometrium implantation, so it is fundamental to create practical and trustable methods for monitoring the post-hatching embryo development. Considering this necessity, a post-hatching culture system denominated PHD (Post Hatching Development) system was established. In this system, in vitro produced embryos were cultured in agarose gel tunnels under a modified culture medium and the obtained data revealed that it was capable to sustain embryonic cell differentiation in trophoblast, hypoblast and epiblast, including the Rauber's layer formation, defining the embryonic disc. This represents the first complete experimental model to promote rapid growing and post-hatching differentiation in vitro, able to be successfully used to monitor the late effect of treatments in the culture system. Preliminary data of its use to monitor toxic substances and gene expression were obtained and are described in this thesis. Additionally to the PHD system, a second work focused on the simplification and pattern of in vitro embryo production. For that, we suggested the freezing and stocking of ready-to-use medium. The results obtained in two different systems (DIAS-Dinamarca and Embrapa- Brasil) have shown that it is possible to produce embryos in previously frozen medium without affecting embryo rates. Besides facilitating the laborious routine of medium production, freezing aliquots has allowed to create a pattern among different manipulations, considering that the medium batch was always the same. In conclusion, both works developed in this thesis, one more scientific and the other more applied, try to contribute in non explored areas and clearly show that there are gaps to be investigated for enhancing the results in in vitro embryo production.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

CAPÍTULO 1	1- INTRODUÇÃO	14-51
	2- REVISÃO DE LITERATURA	
	3- TEMA DA TESE	
	4- OBJETIVOS DA TESE	
CAPÍTULO 2	Desenvolvimento Pós – Ecloração: um novo sistema de cultivo in vitro de embriões bovinos	52-77
CAPÍTULO 3	Criopreservação de meios prontos para uso	78-97
CAPÍTULO 4	Discussão geral e considerações finais	98-107

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP	Adenisina tri-fosfato
BSA	Bovine serum albumin (albumina sérica bovina)
CL	Corpo lúteo
D	Dia – referente ao dia de vida do embrião
DNA	Deoxyribonulceic acid (ácido desoxirribonucléico)
PHD	Post hatching system (sistema pós-eclosão)
FSH	Follicle stimulating hormone (hormônio folículo-estimulante)
FISH	Fluorescent in situ hybridization (técnica de hibridização in situ)
Glut-1	Gene transportador de glicose
LH	Luteinizing hormone (hormônio luteinizante)
IGF	Insulin-like growth factor
IFN-τ	Interferon-tau
UI	Unidades internacionais
MCI	Massa celular interna
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinases
PCR	Polimerase chain reaction
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PIV	Produção in vitro
PBS	Phosphate buffer saline
RNA	Ribonulceic acid (ácido ribonucléico)
SFB	Soro fetal bovino
SOF	Synthetic oviductal fluid (fluido sintético de oviduto)
SOFaaci	SOF adicionado de aminoácidos e citrato de sódio
TCM	Tissue culture medium (meio para cultura de tecidos)
TE	Transferência de embriões
TEP	Trophectoderm projections (projeções do trofectoderma)
TN	Transferência nuclear
\emptyset	Diâmetro

Outras abreviaturas mencionadas na tese podem ser encontradas no **Instructions to author**, *Biology of Reproduction* (2004) – <http://www.bioreprod.org>

CAPÍTULO 1

Introdução e Revisão de literatura

1. Introdução

O desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida em animais permitiu um grande avanço na otimização do potencial produtivo de fêmeas e na multiplicação de material genético de interesse para a produção animal. Estas técnicas assumem ainda papel fundamental na conservação e regeneração de espécies animais ameaçadas de extinção. A maioria delas envolve a manipulação dos gametas, ou mesmo do próprio embrião, para obtenção de embriões de forma que estes possam ser produzidos em maior escala. Os embriões produzidos são então transferidos para receptoras que levarão a gestação a termo, permitindo a obtenção de vários produtos de uma mesma fêmea, simultaneamente.

As principais técnicas de obtenção de embriões transferíveis são: a lavagem uterina de embriões produzidos *in vivo*, a produção *in vitro* de embriões (PIV), a bi-partição de embriões, e a clonagem por transferência nuclear (TN). Entretanto, foi com o advento da produção *in vitro* de embriões, que a capacidade de multiplicação de indivíduos e a possibilidade de expansão rápida de material genético de importância foram possíveis. Neste contexto, o Brasil tornou-se o terceiro país no mundo em volume de aplicação da técnica (Rodrigues, J.L., comunicado pessoal). A aspiração de ovócitos imaturos diretamente dos ovários das fêmeas e a continuidade de sua maturação e fecundação em sistema controlado permitiram que em média até 70 crias por ano sejam produzidas de uma única fêmea (Peixer et al., 1996; Nibart et al, 1997). Com o estabelecimento da produção *in vitro* de forma consistente, foi possível o desenvolvimento de técnicas mais complexas como clonagem por transferência nuclear e a transgênese.

No entanto, na medida em que se aumenta o grau de interferência na produção de embriões, crescem proporcionalmente os problemas de desenvolvimento embrionário e as dificuldades para a manutenção de uma gestação normal (Farin et al., 2001). Segundo

Keller (1998), cerca de 20% das gestações são perdidas entre o estágio de blastocisto (Dia 7 da gestação) e a fase de reconhecimento da gestação (Dia 16 da gestação) somente com embriões produzidos in vitro. Uma das hipóteses para a ocorrência desta elevada perda inicial teria origem nas diversas diferenças encontradas entre embriões originados in vivo e embriões produzidos in vitro (Farin et al., 1999; Gjorret et al., 2003), acarretando um número elevado de perdas embrionárias e fetais, além de anormalidades morfo-fisiológicas em animais recém nascidos (Hasler, 2000; Niemann 2000; Farin 2001; Bertolini et al., 2002; Bertolini e Anderson, 2002), o que leva à redução na eficiência da técnica. Ou seja, apesar de todos os avanços na produção de embriões, pode-se afirmar que ainda muito pouco é conhecido sobre quais os fatores envolvidos e qual a natureza das alterações decorrentes do processo de manipulação dos embriões.

Seria pouco razoável considerar que a modificação de apenas um fator nos sistemas de produção in vitro atuais levaria a um incremento absoluto na eficiência da PIV. Segundo McEvoy (2003), a perda de embriões continuará existindo, pois o sistema in vitro não supre todos os fatores encontrados in vivo. Ainda assim, são conseguidas atualmente elevadas taxas de produção de blastocistos tanto para embriões PIV quanto para embriões TN. Diante deste cenário, os dados apresentados hoje na literatura incitam que a produção e desenvolvimento do blastocisto em si não seria um parâmetro ideal para se predizer a viabilidade gestacional do embrião (Campbell et al., 2001; Alexopoulos et al, 2002; Hyttel et al., 2002). Por isto, a necessidade crescente de monitoramento de todas as etapas do desenvolvimento embrionário.

Atualmente, os trabalhos que procuram monitorar e avaliar o desenvolvimento embrionário são na maioria restritos à fase de pré-eclosão, ou até 7-10 dias de vida deste embrião, devido à falta de sistemas competentes na manutenção de embriões pós-eclosão. Esta impossibilidade gera uma lacuna fundamental na investigação dos

processos de desenvolvimento que ocorrem assim que o embrião encontra o ambiente uterino natural e onde estão concentradas grandes partes das perdas. Sendo assim, torna-se imprescindível o acompanhamento do desenvolvimento embrionário até estágios mais avançados. Nesta tentativa, Stringfellow e Thomson (1986) relataram há 20 anos o primeiro experimento com o cultivo prolongado de embriões bovinos, onde foi conseguida a sobrevivência e o alongamento de alguns dos embriões. Mais tarde, Vajta et al. (2000a) e Alexopoulos et al. (2001, 2002) aprofundaram estes estudos investigando componentes do meio de cultivo in vitro e conseguiram também o alongamento e alguma diferenciação morfológica. Apesar de inovadores, os modelos criados nesses experimentos foram ainda inconstantes, e a busca de um sistema completo e estável foi então foco central da primeira etapa do trabalho aqui exposto.

Outro foco desta tese foi a própria rotina de produção in vitro de embriões. Durante a última década, as investigações na embriologia de animais domésticos foram direcionadas principalmente para a obtenção de maiores taxas de produção de embriões, bem como para o incremento das taxas de gestação e nascimento de crias viáveis. Atenção muito menor foi dedicada à racionalização da rotina do laboratório, o que contradiz os esforços diários que objetivam sua padronização e simplificação. Hoje em dia, a rotina inclui o congelamento individualizado de alguns meios estoques e seus componentes (p.ex. soro fetal e hormônios) e o estoque a 4°C de algumas soluções por um período limitado (semanas ou meses), mas invariavelmente inclui a produção semanal ou quinzenal das soluções finais de maturação, fecundação e cultivo. Esta preparação requer considerável tempo, trabalho e custos devido ao desperdício dos agentes químicos em todas as etapas (soluções estoque e meios finais). Além do tempo, esta renovação constante de partidas de meios aumenta em demasia a inconsistência entre rotinas, devido à introdução de novos lotes de químicos e água. Na tentativa de oferecer uma

alternativa para o problema, foi então proposto o congelamento do meio final de uso e investigado seu efeito sobre as taxas de blastocisto e qualidade dos embriões gerados. Os procedimentos foram testados em dois sistemas de produção diferentes (DIAS-Dinamarca e Embrapa-Brasil), o que nos permitiu observar a consistência dos resultados obtidos.

Os dois trabalhos, de investigação de sistemas de cultivo pós-eclosão e da utilização de meios congelados prontos para uso formam então o corpo desta tese, sendo ambos dirigidos para a busca de alternativas em problemas pouco abordados, mas igualmente importantes para a evolução dos sistemas atuais de produção in vitro de embriões bovinos. Resultados de outros experimentos publicados ou não, mas relacionados com os assuntos centrais estão inseridos no corpo da tese, de forma a ficar registrado toda a produção científica realizada no período deste Doutorado.

2. Revisão de Literatura

2.1. Desenvolvimento do embrião pré-eclosão (D0-D7)

O estudo básico da morfologia do desenvolvimento do embrião de mamíferos, especialmente camundongos e bovinos teve início ainda na década de 40. Foi aprofundado e revisado por Betteridge e Fléchon em 1988, e retomado em publicações recentes (Maddox-Hyttel et al., 2003; Fléchon et al., 2004), e deve ser entendido como um processo que tem início já na ovulação e perdura durante toda a gestação.

Sabe-se que o ciclo estral em bovinos tem duração média de 21 dias e é caracterizado por apresentar ondas de desenvolvimento folicular em que apenas um folículo dominante chega à ovulação (Wiltbank et al., 2002). A cada ovulação, o folículo ovariano libera um ovócito maturo que é captado pelas fímbrias do oviduto e é transportado até o local da fecundação, onde permanece até que esta ocorra. O folículo ovulado sofre então, uma série de modificações funcionais e estruturais que originam o corpo lúteo (CL). O evento da fecundação marca o início da idade embrionária, sendo o dia da ovulação definida em embriões gerados in vivo como Dia 0 (D0). O ovócito liberado do folículo pré-ovulatório é captado pelas fímbrias e fecundado no oviduto na região da junção istmo-ampola (Wilmot e Hunter, 1984; Hunter, 1985). A própria ovulação estimula o transporte de espermatozoides funcionais armazenados em um reservatório natural próximo à junção útero-tubárica até a região da fecundação, que ocorre em aproximadamente 2 horas após a ovulação. No trajeto dentro do oviduto, os ovócitos perdem as células do cumulus oophorus remanescentes, sendo estas completamente removidas da zona pelúcida, que fica então exposta (Betteridge e Fléchon, 1988).

A presença da zona pelúcida é fundamental em vários aspectos, mas após a fecundação ela participa principalmente da manutenção da coesão entre os blastômeros

do embrião e acredita-se, seja importante para a manutenção de um micro-ambiente favorável no espaço perivitelíneo. A primeira clivagem do zigoto formado ocorre 24-28 horas após a fecundação, o que é comprovado pelo fato de que maioria dos embriões coletados no final de D1 apresenta apenas duas células (Thiault, 1966 *apud* Betteridge e Fléchon, 1988). A segunda divisão dos blastômeros ocorre até cerca de 60 horas pós-fecundação, sendo 38 horas o mais cedo já encontrado (Sirad e Lambert, 1985). Deste ponto em diante, a divisão dos blastômeros passa a ser um evento assincrônico, tendo sido demonstrado em camundongos (Garbutt et al., 1987) e ovelhas (Fehilly and Willadsen, 1986 *apud* Betteridge e Fléchon, 1986), que os blastômeros que se dividem mais cedo são os que mais contribuem para a formação da massa celular interna (MCI), região que dará origem ao feto propriamente dito. Além de ser um evento assincrônico, os blastômeros realizam sua divisão em partes desiguais, originando células filhas de tamanhos diferentes (Surani e Barton, 1984). Este é um comportamento importante, tendo sido demonstrado em camundongos que as células maiores geralmente formam as células externas e as menores as células internas do embrião em desenvolvimento (Massip et al., 1983).

A atividade divisional do embrião é extremamente intensa, o que permite que os blastômeros sejam contáveis até em torno de 16 células e serem individualizados até aproximadamente 32 células, a partir de quando são denominados de mórula e já tem início seu processo de compactação (Massip et al., 1983). Em torno de D5, a maioria dos embriões passa do oviduto ao útero, e a continuidade da compactação leva à formação da cavidade interna do embrião denominada blastocelo, que surge em torno de D6 em bovinos. O blastocisto inicial (D6) contém por volta de 100 células incluindo MCI e trofotoderma, e atinge em torno de 160 μm - 180 μm de diâmetro externo contando com a zona pelúcida (Linares e King, 1980). O crescimento acelerado do trofoblasto neste

período se deve a mitoses sucessivas do trofotoderma que encobre a MCI. Em camundongos, as novas células-filha são empurradas para as regiões periféricas e a continuidade de sua proliferação depende da relação com a MCI. Esta dependência parece não ser absoluta em bovinos, e são observadas mitoses por todo o trofoblasto e eventualmente o trofotoderma que encobre a MCI termina por degenerar (Linares e King, 1980).

Os blastocistos continuam seu desenvolvimento e quando expandidos contém em torno de 160 células, atingindo aproximadamente 200 células no momento em que eclodem e perdem a zona pelúcida, o que vai ocorrer em torno de D7-D8 em bovinos. A partir desse momento, a viabilidade embrionária é dependente da interação direta do embrião com o útero materno, sendo D7-D8 os dias limites para manipulação do embrião em ambiente externo (Betteridge e Fléchon, 1988). Ainda pouco se conhece de mecanismos de desenvolvimento e interação útero-embrião a partir desta fase, apesar de alguns avanços terem sido obtidos recentemente.

2.2. Desenvolvimento do embrião no período pós-eclosão (D8-D20)

Apesar de algumas publicações recentes (Talbot et al., 2000; Maddox-Hyttel et al., 2003; Fléchon et al., 2004), a descrição do desenvolvimento embrionário pós-eclosão nas espécies domésticas é um tema pouco explorado e que necessita de investigação mais detalhada. O conhecimento aprofundado dos eventos de pré-gastrulação podem gerar informações importantes na avaliação da normalidade do desenvolvimento embrionário, tanto para a melhoria dos sistemas de produção in vitro como na qualidade dos sistemas para embriões clonados ou cultivo de células embrionárias (Maddox-Hyttel et al., 2003).

Alguns estudos iniciais descreveram parte dos processos ocorrentes no embrião bovino na fase de pré-gastrulação (Winters et al., 1942; Greenstein e Foley, 1958;

Fléchon, 1978) e foram revisados por Betteridge et al. (1988) e Guillomot (1995). Os processos descritos nestes estudos estão figurativamente representados na **Figura 1**. Depois de romper a zona pelúcida (Dias 8-10), o embrião adquire forma esférica a ovóide, sendo este um processo que marca o início do alongamento do trofoblasto entre D12 e D14 do desenvolvimento (Betteridge et al., 1988). Em torno de D8 as primeiras células do hipoblasto (ou endoderma primitivo) são formadas a partir das células do botão embrionário e em D10, as células do hipoblasto formam já uma camada confluyente que acompanha toda parte interna do trofoblasto. Em D12, o botão embrionário, agora denominado epiblasto, é encoberto por apenas uma fina camada de células do trofoblasto. Esta película é denominada camada de Rauber (Fléchon, 1978), sendo que o complexo que inclui epiblasto, hipoblasto e a camada de Rauber compõem então o disco embrionário. Em torno de D14 (Winters et al., 1942) ou D16 (Greenstein e Foley, 1958) tem início à formação do mesoderma, e em torno de D20 o alantóide invade o celoma extra-embrionário (Fléchon, 1978). Apesar de antigos, estes trabalhos conseguiram descrever as bases do desenvolvimento que ocorre neste estágio. Entretanto, a profundidade das informações pode ser considerada limitada, fazendo-se necessária a retomada deste tipo de estudo.

Com este objetivo, Maddox-Hyttel e colaboradores (2003) reiniciaram a caracterização do embrião bovino pós-eclosão e reuniram as informações obtidas até então fragmentadas. Para isto, embriões bovinos originados in vivo foram coletados do útero de vacas Holstein em D9, D11, D14 e D21 e processados para análise por microscopia eletrônica e imunohistoquímica com marcadores de células do epiblasto. Neste trabalho, foi confirmado que os embriões em D9 não possuem mais zona pelúcida e ainda mantém aspecto ovóide, da mesma forma que o blastocisto se apresenta. O trofoblasto é composto por células cuboidais, a não ser na camada de Rauber sobre a

MCI, onde se encontram mais delgadas. As células do trofoblasto e do hipoblasto estabelecem contato entre membranas em algumas áreas focais. Desmossomas e tight junctions conectam células adjacentes do trofoblasto, mas as células do botão embrionário estabelecem ligações mais brandas como as interdigitações.

Em torno de D11, os embriões continuam com forma arredondada. As células do trofoblasto são cuboidais a colunares, sendo mais delgadas na camada de Rauber, e continuam com as mesmas ligações por desmossomas e tight junctions. As células do botão embrionário passam a estar mais ligadas com formação inicial de tight junctions. O hipoblasto forma uma delgada camada alinhada sob a MCI e o trofoblasto (Maddox-Hyttel et al., 2003).

O crescimento do trofoblasto e alongamento dos embriões passam a ser então os eventos marcantes de D12 em diante. Em D14 os embriões apresentam forma tubular em sua maioria, com tamanho médio de 5,23 mm, mas uma grande variação de forma e comprimento é encontrada (Bertolini et al., 2002; Maddox-Hyttel et al., 2003). Com a continuidade do desenvolvimento do embrião e seu alongamento, ocorre a degeneração das células do trofoblasto que encobrem a MCI, expondo o epiblasto e estabelecendo assim o botão embrionário. Nos embriões desta fase é possível observar um condensado celular semi-circular entre o epiblasto e hipoblasto que darão origem ao cordão primitivo e depois mesoderma e endoderma (Maddox-Hyttel et al., 2003).

Em D21 os embriões atingem tamanho considerável, sendo que o embrião propriamente dito tem em média 2,86 mm, mas o concepto (embrião e envoltórios) como um todo atinge tamanho superior a 30 cm. A cavidade amniótica é formada, mas existe uma grande variação no desenvolvimento embrionário, com conceptos apresentando desde a formação do cordão primitivo até embriões com formação dos somitos e

alantóide, bem como a neurulação e diferenciação do mesoderma (Maddox-Hyttel et al., 2003).

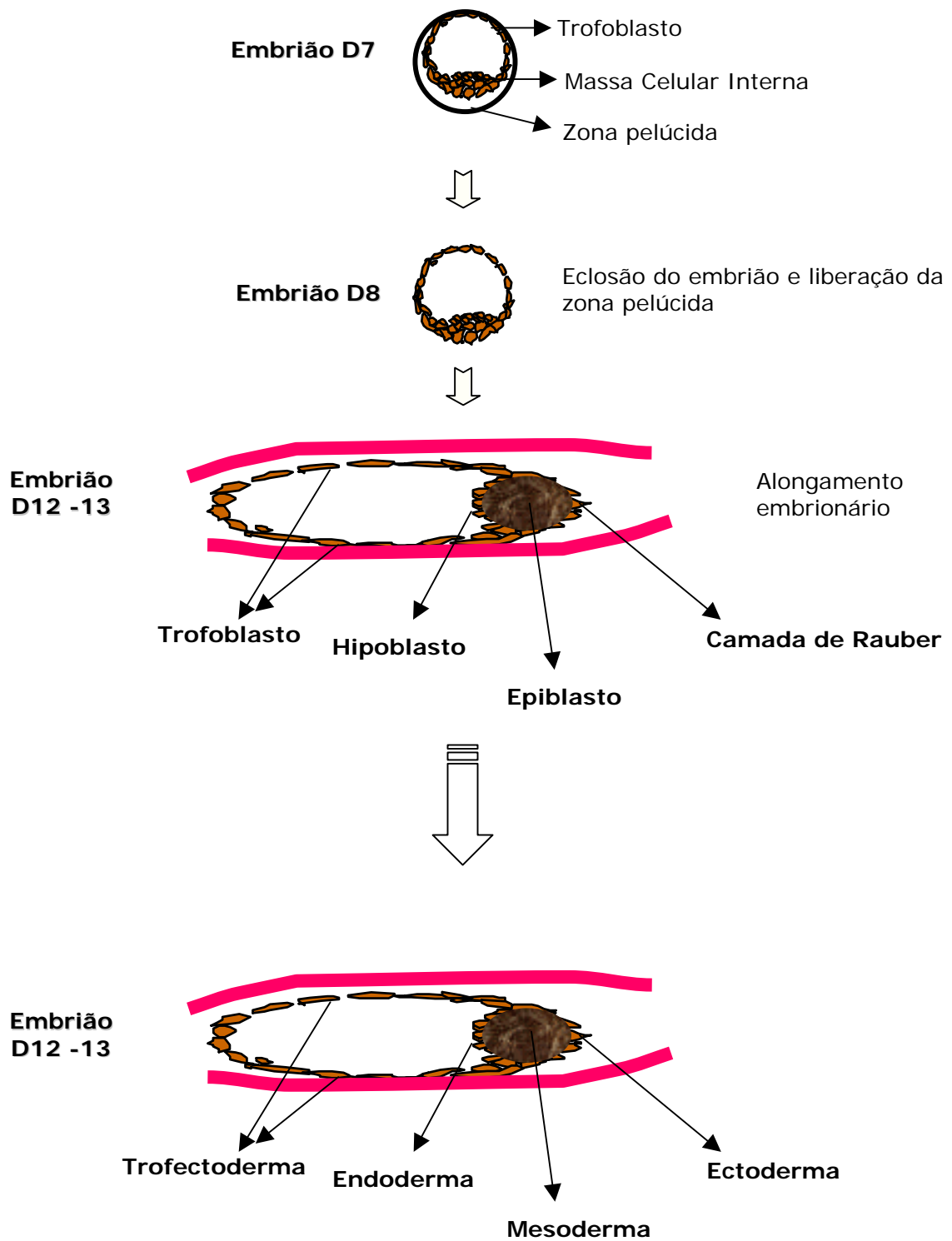


Figura 1 – Desenvolvimento do embrião bovino do Dia 7 (D7) ao Dia 12-13 (D12-13) e os folhetos embrionários originados a partir da diferenciação de suas estruturas.

As observações agrupadas nos trabalhos com o embrião de até 3 semanas de idade sugerem um padrão de desenvolvimento que elucidam alguns eventos chave deste estágio: formação do epiblasto e hipoblasto, definição do botão embrionário, estabelecimento da cavidade amniótica, formação do cordão primitivo, formação do endoderma e mesoderma, e neurulação e diferenciação do mesoderma (Betteridge e Fléchon, 1988; Maddox-Hyttel et al., 2003). Todos estes eventos, entretanto, só serão efetivos para o estabelecimento da gestação se uma sincrônica e complexa interação acontecer com o ambiente uterino materno, envolvendo mecanismos multifatoriais e intrinsecamente correlacionados com a fisiologia e morfologia, tanto materna quanto fetal.

2.3. Estabelecimento da gestação

Para que o conceito presente no ambiente uterino não seja assumido como um corpo estranho e possa ter continuidade de desenvolvimento no organismo materno, são necessários alguns eventos que definem a importante fase do reconhecimento materno da gestação e implantação embrionária (Binelli et al., 2001).

O reconhecimento materno da gestação é um processo cuja responsabilidade compete tanto ao embrião quanto ao organismo materno (Binelli et al., 2001). Fisiologicamente, podemos considerar que na fêmea receptora o reconhecimento tem início ainda na geração do corpo lúteo (CL). O CL é a estrutura responsável pela secreção de grande quantidade de progesterona (P4), necessária para a preparação do útero para uma possível gestação. A manutenção deste ambiente uterino apropriado é fundamental para a continuidade do desenvolvimento embrionário e fetal (Lamming et al., 1989). O CL originado do folículo ovulatório, tem um crescimento contínuo até em torno do dia 10 pós-

ovulação, e tem início sua morte programada ou luteólise (Binelli et al., 2000) em torno do dia 16 pós-ovulação. A luteólise em bovinos ocorre por ação da prostaglandina $F2\alpha$ produzida e secretada pelas células do endométrio (Binelli et al., 2001). Esta é então transportada por um sistema de contracorrente, da veia uterina para a artéria ovariana, chegando ao ovário onde atinge o CL. Portanto, para o estabelecimento da gestação é necessário que o organismo materno reconheça a presença do embrião, evitando a liberação de prostaglandina $F2\alpha$ e mantendo, desta forma, o CL e a produção de progesterona (Wiltbank et al., 2002).

Além dos sistemas de reconhecimento de origem materna, são necessários em conjunto àqueles presentes no próprio embrião. O primeiro deles envolve a produção do interferon - τ (IFN- τ), uma proteína sintetizada e liberada pelas células do trofotoderma, cuja função é sinalizar para que o CL seja mantido e assim impedir a luteólise (Stojkovic et al., 1999). Sua produção tem início com a formação da blastocle no embrião, aumenta em torno de D10-12 e atinge os níveis mais elevados pouco antes da invasão do endométrio pelo embrião (Hernandez-Ledezma et al., 1992), sendo o pico de produção em torno de D17 (Bartol et al., 1985). Mais do que o período de gestação, a elevação na produção de IFN- τ coincide com a transição de uma morfologia arredondada para alongada do blastocisto. A redução na produção de IFN- τ somente pode ser detectada nas regiões que estabeleceram contato celular com o epitélio uterino, mostrando que está intrinsecamente relacionada com o evento da implantação (McCracken et al., 1984).

A prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) é o componente uterino responsável pela luteólise e retorno à ciclicidade, e requer a secreção luteal de oxcitocina, que ao ligar-se a receptores no endométrio, regula a expressão de cicloxigenase (COX-2), enzima responsável pela síntese de $PGF2\alpha$ no útero (Thatcher et al., 2001). O IFN- τ age inibindo a expressão desses receptores endometriais de oxcitocina, suprimindo assim o padrão normal de

liberação da $PGF2\alpha$ uterina, sendo que esta inibição parece ocorrer pela supressão direta de receptores endometriais de estrogênio (McCracken et al., 1984).

Outro fator importante no reconhecimento da gestação é puramente físico, e envolve a ocupação do lúmen uterino ipsilateral ao CL pelo embrião. Ou seja, para bloquear efetivamente a luteólise, o embrião deve estar alongado o suficiente para fazer o contato necessário com a superfície endometrial. Embriões subdesenvolvidos, e que não realizam esta ocupação de forma adequada, são menos capazes de bloquear a luteólise e conseqüentemente podem ser eliminados (Binelli, 2000). Durante o período de reconhecimento, o embrião se transforma em uma estrutura alongada como descrito anteriormente, completando o processo de gastrulação até chegar à formação do feto, altamente definido. Durante este período, as membranas externas que envolvem o feto se modificam de uma estrutura avascular para altamente vascularizada e especializada, o corio-alantóide (Talbot et al, 2000; Maddox-Hyttel et al., 2003; Fléchon et al., 2004). Nos ruminantes, a ligação do feto com o organismo materno é realizada por pontos individuais denominados placentomas, unidade funcional fundamental para as trocas de nutrientes e derivados metabólicos entre mãe e feto (De Sousa et al., 2001).

O período considerado crítico para que o embrião envie este conjunto de sinalizações ao organismo materno, ocorre entre 8 e 17 dias de gestação, justamente quando estão concentradas cerca de 40% das perdas embrionárias em bovinos (Binelli et al., 2001; Thatcher et al., 2001). Além dos fatores inerentes ao organismo materno e ao embrião, vários outros fatores externos influenciam no estabelecimento desta gestação, como nutrição, temperatura ambiente e o estresse (Ju et al., 1999; Binelli et al., 2001; Edwards et al., 2001). Entretanto, são devido às falhas no próprio embrião que grande parte dos problemas de perda de gestação ocorre, como defeitos morfológicos, alterações metabólicas e aberrações cromossômicas, dentre outros, principalmente quando

consideramos embriões originados de sistemas artificiais de produção, como o embrião produzido in vitro (Viuff et al., 2001).

Conforme já citado, o maior índice de perdas de gestação de embriões produzidos in vitro, ocorre com embriões em torno dos dias 8 e 17 de gestação, ou ainda dentro de uma semana após serem transferidos. Na tentativa de investigar o que estaria acontecendo com os embriões nesta fase de perdas, Farin et al. (1999) transferiram embriões produzidos in vivo ou in vitro de mesma qualidade no dia 7 pós-inseminação e recuperaram os mesmos no dia 17 da gestação. Os autores observaram degeneração e perda embrionária acentuada nos embriões produzidos in vitro quando comparados com os produzidos in vivo. Estas coletas mostraram que os blastocistos visualmente equivalentes em qualidade no Dia 7, carregavam informações de desenvolvimento diferenciadas, e que os embriões produzidos in vitro apresentaram maior comprometimento na sua habilidade de sobreviver no ambiente uterino, bem como foram 1,8 vezes mais longos do que os embriões controle. Este tipo de observação deixou clara a riqueza de informações perduradas nos embriões nesta fase inicial da gestação, bem como a importância do monitoramento do seu desenvolvimento.

Concomitante ao reconhecimento da gestação, um evento fundamental é estabelecido para o sucesso da gestação: a implantação embrionária. A implantação é o processo através do qual o blastocisto estabelece contato físico e fisiológico com o útero materno, permitindo que este seja mantido e protegido (Lee e DeMayo, 2004). Apesar das várias diferenças entre espécies dos mecanismos de implantação, parece existir um processo autônomo muito conservado evolutivamente entre a fertilização e início de implantação (McLaren, 1990 *apud* Lee e DeMayo, 2004). Basicamente e na maioria dos mamíferos, o blastocisto é composto pelas células do trofocitoderma que darão origem à placenta, e a MCI que originará o feto propriamente dito. O embrião torna-se competente

a implantar cerca de 4 dias após a fecundação em camundongos, 9 dias no humano e não antes de 30 dias pós-fecundação nos bovinos (McLaren, 1990 *apud* Lee e DeMayo, 2004).

Além do alongamento do trofoblasto e das sinalizações útero-concepto, a gestação depende da implantação. A implantação depende de imprescindíveis modificações físicas do embrião que são menos evidentes e ainda pouco exploradas. O embrião expressa seu potencial invasivo, que está relacionado com processos celulares e bioquímicos do tecido invadido, bem como o status hormonal (Gonzáles et al., 1996). A implantação pode ser dividida em dois eventos principais: ligação e invasão. A ligação ocorre pela aposição de células epiteliais diferentes (trofotoderma e endométrio), que realizam contato apical entre suas membranas. Esta ligação parece ocorrer principalmente através de projeções do trofotoderma (TEP), que são pequenas projeções móveis que surgem antes mesmo do rompimento da zona pelúcida e estabelecem contato com as células do epitélio uterino (Gonzáles et al., 1996). Além de estabelecer regiões de contato, as TEP parecem auxiliar a locomoção do embrião, bem como ter função de absorção de nutrientes até que o embrião consiga se estabelecer. Além disto, as TEP parecem ser as regiões responsáveis pela liberação das enzimas necessárias para a invasão do tecido endometrial (Gonzáles et al., 1996). A invasão propriamente dita, ocorre pela secreção de enzimas proteolíticas, principalmente as metaloproteinases (MMP), que realizam a digestão dos diferentes constituintes da membrana basal do epitélio, como diferentes tipos de colágeno, laminina, fibronectina (Bischof et al., 1998).

Enfim, este conjunto de eventos inter-relaciona definitivamente organismo materno e fetal, sendo esta a base da ligação por toda a gestação. Com o desenvolvimento morfológico normal dos embriões associado aos mecanismos descritos de

reconhecimento materno e implantação embrionária, ficam garantidos os elementos cruciais para o estabelecimento da gestação.

2.4. Produção in vitro de embriões

A produção in vitro de embriões em muito evoluiu nos últimos anos, saindo de uma condição de método de pesquisa e estudo de embriologia, para tornar-se uma técnica viável de utilização comercial. Neste contexto, alguns padrões de produção foram desenvolvidos, apesar de vários fatores individuais serem constantemente modificados.

Como regra geral, os sistemas de produção in vitro utilizam-se de duas soluções definidas como base para todas as etapas de produção: o TCM-199 e/ou o Fluido Sintético de Oviduto (SOF). Tendo estes dois veículos como base, diferentes protocolos que variam entre laboratórios definem uma composição própria de hormônios, sais, aminoácidos e atmosferas que melhor se adaptem às suas condições particulares de trabalho, desde a aspiração do folículo à transferência do embrião gerado.

A produção in vitro de embriões tem por condição o máximo aproveitamento dos estoques ovarianos de ovócitos. Naturalmente, os ovócitos presentes nos ovários das fêmeas bovinas estacionam o processo de divisão meiótica no estágio de prófase I da meiose, e só o retomam quando prestes a ovular. Os ovócitos que não participam do processo de ovulação podem permanecer indefinidamente no ovário e nunca completarem seus processos divisionais (Stojkovic et al., 1999). Quando aspirados, os ovócitos saem do estágio de prófase I da meiose em que se encontram, retomando assim a meiose para completarem o processo de maturação, o que ocorre através da aspiração de folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro (Gordon, 1994; Bols, 1997).

Depois de recuperados, os ovócitos são selecionados de acordo com suas características morfológicas, devendo apresentar um citoplasma homogêneo ou com poucas granulações e células do cumulus com três ou mais camadas ainda compactadas

(Stojkovic et al., 1999). Os ovócitos selecionados são levados à maturação, que de uma forma geral é realizada em meio TCM-199, adicionado de hormônios gonadotrópicos (LH, FSH), uma fonte de proteína (soro fetal ou albumina) e antibióticos (p.ex. penicilina, estreptomicina, gentamicina, etc.), sob óleo mineral ou de silicone e sob atmosfera de 20% O₂ e 5% CO₂. Estes componentes associados em concentrações e combinações diferentes criam as particularidades de cada sistema.

Apesar da grande variação atual nas combinações e concentrações de cada componente, de uma forma geral as taxas atuais de maturação não variam tanto de um sistema para outro. Esta limitação se deve possivelmente à própria qualidade do ovócito (Sirard et al., 2003; Lonergan et al., 2003), o que influenciaria não só a capacidade de maturação como o desenvolvimento embrionário, a gestação e o futuro desenvolvimento fetal (Krisher, 2004). Estes fatores inerentes ao ovócito são bastante variados e pouco conhecidos, mas têm sido investigados nos mais variados níveis por diversos grupos, na tentativa de se aumentar a eficiência da produção in vitro (Dode, 2006). Depois de maturados, os ovócitos seguem para a fecundação, realizada em geral em meio Tyrode modificado (Parrish et al., 1986). Mais do que a solução de fecundação, bastante atenção é hoje voltada ao processamento do sêmen, sabendo-se que suas particularidades afetam o desenvolvimento embrionário posterior (Comizzoli et al., 2000).

Os zigotos formados são levados finalmente ao cultivo, que também apresenta uma grande variedade de protocolos. Historicamente, o TCM-199 adicionado de proteínas e antibióticos, associado ao co-cultivo com células somáticas (p.ex. células VERO, células BRL ou células da granulosa), sob atmosfera de 20% O₂ e 5% CO₂ foi o sistema mais utilizado nos últimos anos (Thibodeux e Godke, 1992; Geshi et al., 1999). Na busca de aprimorar as condições que mais se assemelhassem àquelas do oviduto, Tervit et al. (1972 *apud* Gordon, 1994) propuseram o meio denominado fluido sintético de oviduto

(SOF) sob atmosfera de 5% O₂ e 5% CO₂ sem co-cultivo, fato que aumenta a definição do meio, bem como diminuiu os riscos de contaminação por patógenos (Holm et al., 1999). Mas, somente nos últimos anos o uso do SOF foi disseminado, quando Holm et al. (1999) acrescentaram aminoácidos essenciais e não essenciais, além de citrato de sódio e myoinositol (SOFaaci), tornando o meio mais completo e efetivo. Recentemente, Dode et al. (2001) avaliaram o uso do SOFaaci às condições de cultivo em alta tensão de oxigênio e co-cultivo com células da granulosa, e encontraram nesta adaptação resultados ainda superiores àqueles obtidos no cultivo com TCM-199 tradicional. Além da composição da base de cultivo, diversos experimentos testam ainda a adição de anti-oxidantes (Geshi et al., 1999; Lonergan et al., 1999), nutrientes como lactato, piruvato e glicose (Gardner e Lane, 2000), proteínas e macro-moléculas (Gardner e Lane, 2000; Abe et al., 2002; Farin et al., 2001) e formas de cultivo (Hendriksen et al., 1999; Fukui et al., 2000; Vajta et al., 2000b; Pereira, 2003; Pereira et al., 2005).

Como pode ser observado, são inúmeras as variáveis envolvidas na produção *in vitro*, o que dificulta a eleição de um ou outro componente como mais importante, e aumentando as chances de variação no sistema. Uma das formas de aumentar-se a acérea dos resultados é a padronização da rotina de laboratório. Atualmente, a grande maioria dos laboratórios prepara a base de suas soluções, os denominados meios estoque, conservando-os congelados ou refrigerados a 4°C por no máximo algumas semanas. Já os meios finais prontos para uso, seguem uma rotina de preparação semanal, ou no máximo quinzenal. Como consenso geral, este procedimento evitaria que componentes lábeis como fontes de proteína, hormônios e macro-moléculas percam sua atividade biológica, ou mesmo impediria a deposição de substâncias importantes como os minerais.

Entretanto, estes procedimentos de renovação periódica criam uma rotina laboriosa que consome grande tempo, mas principalmente, aumentam os custos e as variações dos resultados da rotina. Uma das formas de se minimizar estas perdas seria através do congelamento de alíquotas exatas dos meios já prontos para uso, incluindo hormônios e fonte de proteína. Não há publicação oficial na literatura de tal procedimento, mas relatos individuais afirmam que tal procedimento levaria à perda da atividade principalmente dos hormônios e das macro-moléculas (Mini Tub, relato informal), combinados à precipitação de minerais como o cálcio (Holland Genetics, relato informal) sendo, portanto, um procedimento desencorajado.

Enfim, todos estes elementos individualmente ou em conjunto, buscam aumentar a semelhança das condições encontradas in vivo, objetivando o avanço dos resultados de produção in vitro de embriões. Entretanto, todos estes esforços ainda não foram capazes de aumentar significativamente as taxas de desenvolvimento embrionário e fetal. Isto indica que o ovócito e embrião possuem muito mais elementos intrínsecos que podem ser carregados a estágios mais avançados do desenvolvimento, expondo assim as muitas diferenças entre embriões produzidos in vitro comparados aos embriões naturais, inclusive a imprecisão humana.

2.5. Diferenças entre o embrião produzido in vivo x in vitro

Como descrito, ainda que cada vez mais eficientes, os sistemas artificiais de produção de embriões não reproduzem com exatidão o sistema natural, e por este motivo geram modificações e adaptações que alteram a composição embrionária. Quando comparados aos embriões produzidos in vivo, os embriões produzidos in vitro possuem características diferentes, as quais possivelmente determinam o começo de uma série de problemas que levam à redução na eficiência da técnica (Farin et al, 1999). Isto pode ser

comprovado quando na produção in vitro de embriões, cerca de apenas 30-50% dos ovócitos inseminados chegam ao estágio de blastocisto e os índices de gestação estão em torno de 39% (Hasler et al., 1995).

Entre as diversas diferenças identificadas entre embriões in vitro quando comparados com embriões in vivo são alterações morfológicas, maior vacuolização, desenvolvimento mais lento, maior opacidade (Sirard e Lambert, 1985), menor número de células embrionárias, (Greve et al., 1993), menor densidade de mitocôndrias e maior densidade de lípidos (Crosier et al., 2000; Crosier et al., 2001). Farin et al. (2001), por exemplo, demonstraram que embriões produzidos in vitro são menos compactados no estágio de mórula, têm variação na coalescência dos blastômeros, possuem aparência mais opaca e menor espaço perivitelíneo. Além disto, os blastocistos podem alterar a coloração por influência do meio de cultivo, bem como terem junções incompletas entre as células do botão embrionário e do trofotoderma. Crosier et al. (2001) também compararam diversos aspectos ultra-estruturais de embriões produzidos in vivo e in vitro. Dentre várias constatações, foi observada uma maior densidade de lípidos em embriões produzidos in vitro, o que sugere que estes embriões utilizariam mais deste componente do meio de cultivo ou que seu metabolismo (realizado pelas mitocôndrias) estaria reduzido. Esta hipótese foi reforçada pela redução na densidade das mitocôndrias nos blastocistos produzidos in vitro, bem como na redução da proporção do volume das mitocôndrias em relação ao citoplasma à medida que o embrião se desenvolvia.

Normalmente, o citoplasma de embriões bovinos produzidos in vitro ou in vivo, tem uma grande quantidade de gotas de lípidos. Os lípidos produzidos ou acumulados são utilizados pelas mitocôndrias na produção de ATP (Schneider e Potter, 1949 apud Farin et al., 2001). O ATP é o substrato fundamental para atividade da enzima Na/K-ATPase, que regula a cavitação e acúmulo de fluido na blastocele, que é um processo fundamental

para a diferenciação entre as células do botão embrionário e as células do trofoblasto. As mitocôndrias, portanto são estruturas essenciais para todo o desenvolvimento embrionário e fetal, e estes achados ofereceriam mais uma explicação potencial para a redução das taxas de gestação de embriões produzidos in vitro.

Outras diferenças morfológicas importantes do embrião produzido in vitro são relatadas na literatura. Sabe-se, por exemplo, que o número de células existentes no embrião é fundamental para a continuidade de seu desenvolvimento, e em geral, os blastocistos produzidos in vitro possuem menor número de células do que blastocistos originados in vivo (Van Soom et al., 1996; Van Soom et al., 1997). Embriões oriundos de ovócitos maturados in vivo possuem também mais células do que aqueles originados de ovócitos maturados in vitro. É interessante observar que esta diferença no número de células já é encontrada a partir do dia 3 pós-inseminação, tornando-se ainda mais significativa após a ativação do genoma embrionário (Viuff et al., 2000; Viuff et al., 2001) o que retoma a relação entre as deficiências encontradas e a atividade gênica do embrião.

Nos estágios iniciais, o embrião é dependente da atividade transcricional e protéica dos componentes estocados no citoplasma do ovócito, ou seja, de origem materna. Estes fatores são gradualmente substituídos por produtos gerados pelo genoma do próprio embrião (De Sousa et al., 1998). A capacidade de expressão dos genes embrionários para a realização dos processos futuros no embrião, é de fundamental importância para o seu desenvolvimento normal. Neste contexto, Wrenzycki et al. (1999) constataram que em embriões gerados in vivo há uma maior atividade nos genes responsáveis pelas proteínas envolvidas na compactação e cavitação, metabolismo (transportador de glicose-1), processador de RNAm [poli (A) polimerase] e estresse (heat shock protein 70). O período correspondente a esta diferença tem início no embrião de 8 a 16 células, período

correspondente no bovino, à substituição da responsabilidade transcricional (De Sousa et al., 1998).

Diante dos dados apresentados, tornou-se natural a investigação aprofundada das possíveis alterações gênicas e sua correlação com os problemas que estavam ocorrendo. Para tanto, Viuff et al. (1999) através da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), relataram que até 25% dos embriões produzidos por tratamento de superovulação em bovinos podem ter células poliplóides. Já com os embriões produzidos *in vitro*, foi encontrado que até 72% dos embriões eram mixaplóides. A mixoploidia pode ocorrer tanto em embriões *in vivo* quanto *in vitro*, mas o que chama a atenção é sua frequência aumentada e sua ocorrência em estágios mais precoces do desenvolvimento em embriões produzidos *in vitro* quando avaliados dos dias 2 a 5 de vida (Viuff et al, 2000; Viuff et al., 2001). Além disto, a ocorrência de poliploidia “verdadeira”, ou seja, todas as células do embrião apresentando poliploidia decreve um fenômeno encontrado somente em embriões produzidos *in vitro*, não sendo observado nos produzidos *in vivo*. Prosseguindo nesta linha, Viuff et al. (2000) observaram que as aberrações cromossômicas podem ter início já no processo de maturação do ovócito *in vitro*. Esses autores encontraram que 50% dos blastocistos produzidos de ovócitos maturados *in vitro* continham aberrações cromossômicas, contrastando com apenas 21% dos blastocistos produzidos a partir de ovócitos maturados *in vivo*.

Alguns genes específicos são bons indicadores metabólicos ou de desenvolvimento embrionário têm sido frequentemente utilizados na investigação de diferentes embriões. Um deles, o gene transportador de glicose-1 (Glut-1), tem sido muito utilizado, pois é o mediador da incorporação de glicose nas células embrionárias, sendo imprescindível na evolução do embrião do estágio de mórula para blastocisto (Leese, 1995). Neste contexto, Wrenzycki et al. (1998, 2001) constataram que a expressão de

mRNA Glut-1 é quase dobrada nos embriões originados in vivo quando comparados a embriões produzidos in vitro.

Estes dados expõem a fragilidade deste embrião, fato que pode comprometer o estabelecimento da gestação, que para ocorrer, depende de uma complexa interação sinalizadora entre embrião e organismo materno. Entretanto, esta interação parece estar deficitária quando observamos os índices atuais de gestação de embriões produzidos in vitro, além de alterações importantes como casos de hidroalantóide e peso excessivo ao nascimento (Hasler et al., 1995; Kruij e Den Daas, 1997). De Sousa et al. (2001) avaliaram placentas e fetos entre 16 e 35 dias de gestação, originados de embriões de ovinos produzidos in vitro ou embriões clonados, utilizando vários parâmetros morfológicos como coloração da pele, tamanho de cabeça, largura de costelas, caixa torácica, garupa, etc. Os autores constaram que mais de 50% dos fetos clonados apresentaram menor desenvolvimento e morreram, ou ainda se encontravam em processo de morte. Pouca ou nenhuma evidência de um processo semelhante foi encontrada para embriões produzidos in vitro somente. Este elevado índice de anormalidades foi estreitamente associado com a observação de placentas avasculares ou hipovasculares, o que foi demonstrado em outras espécies também (Kato et al., 1999; Hill et al., 2000), e demonstra que as injúrias podem ser ainda ser somáticas e cumulativas.

Há algum tempo diversos experimentos demonstram que os processos de cultivo in vitro e manipulação celular e embrionária alteraram significativamente a capacidade de manutenção e desenvolvimento do embrião no ambiente uterino (Stice et al., 1994; Loskutoff et al., 1993; Reichenbach et al., 1992). Trabalhos iniciais que investigam as diferenças no status da sinalização de reconhecimento materno mostraram que embriões produzidos in vitro e transferidos no dia 4 pós-inseminação tiveram posteriormente uma

maior produção de IFN- τ , quando comparado com os embriões que continuaram a ser cultivados in vitro. Estes dados sugerem que o ambiente uterino parece ser benéfico para a máxima expressão da sinalização anti-luteolítica do embrião (Hernandez-Ledezma et al. 1992). Associado a estes dados, Hernandez-Ledezma et al. (1992) constataram que embriões produzidos in vitro e com pior qualidade morfológica, têm menor capacidade de secretar IFN- τ . Stojkovic et al. (1999) tornaram esta investigação mais ampla e compararam a produção de IFN- τ e o crescimento do trofoblasto de vários tipos de embrião: produzidos in vivo, embriões bi-partidos, embriões produzidos in vitro ou clonados, dos dias 8 a 23 do desenvolvimento. Esses autores encontraram que durante este período, a secreção de IFN- τ aumenta independentemente do tipo de embrião, mas que é significativamente mais baixa nos embriões produzidos in vitro ou clonados. Esta deficiência contribuiria de modo importante nas menores taxas de prenhez encontradas para embriões produzidos in vitro ou mesmo clonados.

Todas as alterações até aqui relatadas para embriões produzidos in vitro são possivelmente causadas pela exposição a um ambiente, que ainda que procure ser o mais próximo possível daquele encontrado no útero, ainda não é o ideal para o desenvolvimento embrionário. Um dos problemas está relacionado com o próprio fato dos sistemas de maturação ovocitária e cultivo embrionário hoje existentes são praticamente estáticos, não havendo renovação contínua das soluções utilizadas. Portanto, os produtos adicionados intencionalmente ou mesmo os liberados pelo próprio ovócito ou embrião, sofrem acúmulo significativo na solução, tendo poder de alterar a composição tanto do meio quanto do embrião produzido (Barnes, 2000). O mais comum seria o acúmulo de radicais livres, produto de intensa atividade metabólica. Takahashi et al. (2000) correlacionaram o estresse oxidativo com a quebra de DNA em embriões bovinos cultivados in vitro sob tensão de oxigênio de 20% ou de 5%. Para esta detecção, foi

utilizada a técnica de “comet assay”, que indica a extensão e a quantidade de DNA que está em processo de fragmentação. Os resultados encontrados indicam que na concentração de 20% de O₂, maiores são as injúrias no DNA ($p < 0,001$), bem como menor é o desenvolvimento dos embriões ($p < 0,001$) quando comparado ao cultivo a 5% de O₂. A liberação de radicais livres, principalmente o H₂O₂ é um processo constante derivado do metabolismo embrionário, que deve ser neutralizado ou removido constantemente do ambiente onde se desenvolve o embrião. Entretanto, nos sistemas estáticos de cultivo, esta remoção não é realizada, e normalmente a tensão de oxigênio é de 20%, o que agrava a produção destes radicais.

Ou seja, são diversos os trabalhos que mostram que o embrião PIV, ainda que morfológicamente normal, pode carrear deficiências moleculares importantes, reforçando assim a continuidade deste tipo de abordagem também em estágios mais avançados do desenvolvimento, como o período pós-eclosão.

2.6. Monitoramento de embriões bovinos pós-eclosão (após D7)

O cultivo in vitro temporário de embriões pós-eclosão é descrito nas mais diferentes espécies como primatas (Pope et al., 1982; Enders et al., 1989; Kruip e Den Daas, 1997), ratos (New, 1978; Balls e Hellsten, 2002), coelho (Pitt e Carney, 1999), marsupiais (Cruz et al., 2000) e hamsters (Wlodarczyk et al., 2001), sendo utilizado como ferramenta de estudos de potencial tóxico de componentes com efeitos teratogênicos ou influência genética nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário. Entretanto, neste tipo de estudo, os embriões ou fetos iniciais eram lavados do útero materno no período de interesse e geralmente eram mantidos em meio simples por curto período de tempo. Nenhum destes trabalhos descreve um sistema de cultivo in vitro completo.

Apesar de ser um tema até hoje pouco explorado, a busca pelo estabelecimento de um sistema de cultivo in vitro de embriões bovinos nesse período pós-eclosão teve início há 20 anos. A primeira observação do crescimento de embriões bovinos nesse período foi realizada por Stringfellow e Thomson (1986), sendo discretamente relatado em um boletim do Alabama Agricultural Experiment Station. Os autores cultivaram embriões coletados através de lavagem uterina em túneis de gel de agarose e conseguiram observar o alongamento das estruturas. Depois deste período, 15 anos seguiram-se sem que nenhuma publicação semelhante. Somente em torno do ano 2000, Poul Maddox-Hyttel e Gábor Vajta voltaram a realizar ensaios que pudessem ajudar nos estudos de embriologia, principalmente na investigação dos processos de diferenciação de embriões bovinos no período pós-eclosão.

Retomando a linha investigativa iniciada no Alabama, Vajta et al. (2000a, 2001), cultivaram embriões produzidos in vitro dentro dos mesmos túneis de gel de agarose semelhantes àquele modelo proposto por Stringfellow e Thomson (1986). Os autores conseguiram não somente o alongamento das estruturas, mas também sua sobrevivência por um longo período (até Dia 26) e sinais iniciais de diferenciação celular. Na intenção de melhorar o sistema proposto, embriões entre os Dias 11 e 15 produzidos in vitro foram cultivados sob diferentes substratos e condições de atmosfera (Alexopoulos, 2001; Alexopoulos et al. 2002). Apesar de ter sido observada a formação de uma camada incompleta de células do trofoblasto, um extensivo sinal de degeneração foi produzido e nenhum sinal mais avançado de diferenciação foi observado.

Concomitantes a este tipo de estudo, alguns outros pré-experimentos apontavam para o fato de que o embrião após a eclosão tem uma necessidade maior de alguns substratos, como o soro fetal e oxigênio para que se desenvolva (Alexopoulos et al., 2002). A partir destas observações, Hyttel et al. (2002) realizaram avaliações de embriões

produzidos in vivo e in vitro, utilizando o ainda o SOFaaci como solução base, tendo adicionado a esta solução uma concentração mais elevada de soro fetal bovino (50%) e de O₂ (40%), além de terem preparado no fundo da placa uma camada de matriz gel de colágeno reconstruído. Os embriões foram cultivados do dia 8 ao dia 29 após a inseminação, e através de microscopia eletrônica de transmissão e imunohistoquímica, foram observadas várias alterações no desenvolvimento como alterações de conformação, visualização de várias vesículas e processos degenerativos. Apesar das várias alterações observadas, as modificações realizadas no sistema de cultivo foram consideradas fundamentais para a sobrevivência dos embriões até estágios tão avançados. Alexopoulos et al. (2002) chamaram também a atenção para que a fonte de proteína utilizada no período pré-eclosão pode influir na capacidade de desenvolvimento do embrião cultivado in vitro após a eclosão.

Um outro fator importante seria a fonte de energia a ser utilizada pelo embrião nos estágios mais avançados. Até o período pré-eclosão, o embrião bovino não tem necessidade estrita de carboidratos ou açúcares para o seu metabolismo, utilizando principalmente o ácido pirúvico como fonte de energia (Kim et al., 1993; Barnett & Bavister, 1996). Já nos estágios mais avançados do desenvolvimento, o embrião passa a ter necessidade de moléculas de elevada energia como a glicose, por exemplo, sendo inviável sua continuidade na ausência de um substrato (Bavister, 1995). Baseados nestes conceitos, as soluções de cultivo normalmente têm estes açúcares em baixas concentrações (TCM-199) ou mesmo ausentes (SOFaaci). Portanto, a utilização destas soluções de cultivos nas fases mais avançadas do desenvolvimento, certamente irá requerer a adição de componentes energéticos como a glicose, frutose ou sacarose para permitir a continuidade do desenvolvimento embrionário (Vajta et al., 2004). Dados como o substrato e a concentração ideais para este desenvolvimento, bem como de outros

componentes, ainda não foram investigados na literatura, ou contam apenas com trabalhos escassos e resultados inconsistentes.

Recentemente, Vajta et al., (2004) publicaram a versão mais próxima do sistema completo de cultivo, mas ainda sem sucesso na formação do disco embrionário. Este trabalho compila todos os dados obtidos até o momento, e evidencia a base para as evoluções propostas no corpo desta tese, na intenção de finalmente, estabelecermos um sistema de cultivo pós-eclosão repetível e confiável.

2.7. Referências Bibliográficas

- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, v.61, p.57-66, 2002.
- ALEXOPOULUS, N.I. In vitro culture and characterization of post-hatching bovine embryos. Victoria, Australia: Monash University; 2001. Tese.
- ALEXOPOULUS, N.I., MADDOX-HYTTEL, P., VAJTA, G. Effect of protein supplementation on establishment of a hypoblast layer in IVP bovine embryos. *Theriogenology*, v. 57, p.513, 2002.
- BALLS, M., HELLSTEN, E. Statement on the scientific validity of the postimplantation rat whole-embryo culture assay - an in vitro test for embryotoxicity. *Altern.Lab.Anim.*, v.30, p.271-273, 2002.
- BARNES, F.L. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology*, v.53, p.649-658, 2000.
- BARNETT, D.K., BAVISTER, B.D. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol.Reprod.Dev.*, v.43, p.105-133, 1996.
- BARTOL, F.F., ROBERTS, R.M., BAZER, F.W. et al. Characterization of proteins produced in vitro by periattachment bovine conceptuses. *Biol. Reprod.*, v.32, p.681-693, 1985.
- BAVISTER,B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reprod. Update*, v.1, p.91-148, 1995.
- BERTOLINI, M., ANDERSON, G.B. Placenta as a contributor to production of large calves. *Theriogenology*, v.57, p.181-187, 2002.
- BERTOLINI, M., STEPHEN, W.B., HOSUP, S. Growth, development, and gene expression by in vivo and in vitro produced day 7 and 16 bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v.63, p.318-328, 2002.
- BETTERIDGE, K.J., FLÉCHON, J.E. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology*, v.29, p.155-187, 1988.
- BISCHOF, P., MEISSER, A., CAMPANA, A. Involvement of trophoblast in embryo implantaion: regulation by paracrine factors. *J. Reprod.Immun.*, v.39, p.167-177, 1998.
- BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: Simpósio sobre o controle farmacológico do ciclo estral de ruminantes. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, USP, 2000.

- BINELLI, M., THATCHER, W.W., MATTOS, R. et al. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1451-1463, 2001.
- BOLS, P.E.J. Transvaginal ovum pick-up in the cow: technical and biological modifications. Merelbeke: University of Gent, 1997. 228p. Thesis.
- CAMPBELL, K.H., ALBERIO, R., LEE, J.H. et al. Nuclear transfer in practice. *Cloning Stem Cells*, v.3, n.4, p.201-208, 2001.
- COMIZZOLI, P., MARQUANT-LE-GUIENNE, B., HEYMAN, Y. et al. Onset of the S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. *Biol. Reprod.*, v.62, p.1677-1684, 2000.
- CROSIER, A.E., FARIN, P.W., DYKSTRA, M.J. et al. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol. Reprod.*, v.64, p.1375-1385, 2000.
- CROSIER, A.E., FARIN, P.W., DYKSTRA, M.J. et al. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. *Biol. Reprod.*, v.62, p.1459-1465, 2001.
- CRUZ, Y.P., HICKFORD, D., SELWOOD, L. A staging scheme for assessing development in vitro of organogenesis stage embryos of the stripe-faced dunnart, *Sminthopsis macroura* (Marsupiala:Dasyuridae). *J. Reprod. Fertil.*, v.120, p.99-108, 2000.
- DE SOUSA, P.A., KING, T., HARKNESS, L. et al. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol.Reprod.*, v.65, p.23-30, 2001.
- DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. *Acta Sci. Vet.*, v.34, p.115-130, 2006. Suppl.
- DODE, M. A. N.; MATTOS, L.; RUMPF, R. *In vitro* production of bovine embryos in SOFaa medium under high oxygen tension. *Theriogenology*, v.57, p.661, 2001. Abstract.
- EDWARDS, J.L., KING, W.A., KAWARSKY, S.J. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology*, v.55, n.1, p.209-223, 2001.
- ENDERS, A.C., BOATMAN, D., MORGAN, P. et al. Differentiation of blastocysts derived from in vitro fertilized Rhesus monkey ova. *Biol.Reprod.*, v.41, p.715-727, 1989.
- FARIN, P., CROSIER, A.E., FARIN, C.E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, v.55, p.151-170, 2001.

- FARIN,P.W., FARIN,C.E., CROSIER,A.E. et al. Effect of in vitro culture and maternal insulin-like growth factor-I on development of bovine conceptuses. *Theriogenology*, v.51, p.238, 1999.
- FLÉCHON, J.E. Morphological aspects of embryonic disc at the time of its appearance in the blastocyst of farm mammals. *Scanning Electron Microscopy*, v.2, p.541-548, 1978.
- FLÉCHON, J.E., DEGROUARD, J., FLÉCHON, B. Gastrulation events in the prestreak pig embryo: ultrastructure and cell markers. *Genesis*, v. 38, p.13-25, 2004.
- FUKUI, Y.; KIKUCHI, Y. KONDO, H. et al. Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. *Theriogenology*, v.53, p.1553-1565, 2000.
- 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.2, p. 325-32, 1987.
- GARDNER, D. K.; LANE, M. Embryo culture systems. In: Handbook of in vitro fertilization, CRC, 2. ed.,2000, Cap 11, 558 p.
- GESHI, M.; YONAI, M.; SAKAGUCHI, M.; NAGAI, T. Improvement of *in vitro* co-culture system for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with β -mercaptoethanol. *Theriogenology*, v.51, p.551-558, 1999.
- GJORRET, J.O., KNIJN, H.M., DIELEMAN, S.J. et al. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol Reprod.*, v.4, p.1193-200, 2003.
- GONZÁLES, D.S., JONES, J.M., PINYOPUMMINTR, T. Trophectoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts. *Human Reprod.*, v.11, p.2739-2745, 1996.
- GORDON, I. In: Laboratory production of cattle embryos. London: CAB International, 1994. 640p.
- GREENSTEIN, J.S., FOLEY, R.C. Early embryology of the cow. I. Gastrula and primitive streak stages. *J.Dairy Sci.*, v.41, p.409-421, 1958.
- GREVE, T., AVERY, B., CALLENSSEN, H. Viability of in vivo and in vitro produced bovine embryos. *Reprod. Dom. Anim.*, v.28, p. 164-169, 1993.
- GUILLOMOT, M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.49, p.39-51, 1995.

- HASLER, J.F. In vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Hum. Reprod.*, v.5, p.47-58, 2000. Suppl.
- HASLER, J.F., HENDERSON, W.B., HURTGEN, Z.Q. et al. Production, freezing and transfer of IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, v.43, p.141-152, 1995.
- HENDRIKSEN, P. J. M., BEVERS, M. M., DIELEMAN, S. Single IVP using BRL cell co-culture and serum yields a lower blastocyst rate than group culture. *Theriogenology*, v.51, p.319, 1999.
- HERNANDEZ-LEDEZMA, J.J, SIKES, J.D., MURPHY, C.N. et al. Expression of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by in vitro techniques. *Biol. Reprod.*, v.47, p.374-380, 1992.
- HILL, J.R., LONG, C.R., LOONEY, C.R. et al. Placental abnormalities in first trimester somatic cell cloned fetuses. *Theriogenology*, v.53, p.218, 2000.
- HOLM, P., BOOTH, P.J., SCHMIDT, M.H. et al. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaaci medium supplemented with sodium citrate and myoinositol with or without serum. *Theriogenology*, v.52, p.683-700, 1999.
- HUNTER, R.H.F. Experimental studies of sperm transport in sheep, cows and pigs. *Vet. Rec.*, v.116, p.188, 1985.
- HYTTEL, P., ALEXOPOULUS, N.I., LEWIS, I. Post-hatching development of bovine embryos in vivo and in vitro. *Theriogenology*, v.57, p.497, 2002.
- JU, J-C., PARKS, J., YANG, X. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. *Mol. Reprod. Dev.*, v.53, n.3, p.336-340, 1999.
- KATO, Y., RIDEOUT III, W.M., HILTON, K. et al. Developmental potential of mouse primordial germ cells. *Development*, v.126, p.1823-1832, 1999.
- KELLER, M.L., ROBERTS, A.J., SEIDEL, G.E. Characterization of insulin-like growth factor-binding proteins in the uterus and conceptus during early conceptus elongation in cattle. *Biol.Reprod.*, v.59, p.632-642, 1998.
- KIM, J., NIWA, K., LIM, J. et al. 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. *Biol. Reprod.*, v.48, p.1320-1325, 1993.
- KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. *J.Anim.Sci.*, v.82, p.14-23, 2004. E-Suppl.

- KRUIP, T.A., DEN DAAS, J.H. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, v.47, p.433-52, 1997.
- LAMMING, G.E., DARWASH, A.O., BACK, H.L. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. *J.Reprod.Fertil.*, v.37, p.245-252, 1989.
- LEE, K.Y., DEMAYO, F.J. Animal models of implantation. *Reproduction*, v.6, p.679-695, 2004.
- LEESE, H.J. Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Human Reprod. Update*, v.1, p.63-72, 1995.
- LINARES, T., KING, M.A. Morphological study of the bovine blastocyst with phase contrast microscopy. *Theriogenology*, v.14, p.123-133, 1980.
- LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A. et al. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression. *Reprod. Domest. Anim.*, v.38, p.259-267, 2003.
- LOSKUTOFF, N.M., JOHNSON, W.H., BETTERIDGE, K.J. The developmental competence of bovine embryos with reduced cell numbers. *Theriogenology*, v.39, p.95-108, 1993.
- MADDOX-HYTTEL, P., ALEXOPOULUS, N.I., VAJTA, G. et al. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. *Reproduction*, v.125, p.607-623, 2003.
- MASSIP, A., ZWIJSEN, W., MULNARD, J. Cinematographic analysis of the cleavage of the cow egg from 2-cell to 16-cell stage. *Arch. Biol.*, v.94, p.99-106, 1983.
- MCCRACKEN, J.A., SCHRAMM, W., OKULICZ, W.G. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF, from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation during early pregnancy. *Anim. Reprod.Sic.*, v.7, p.31-55, 1984.
- McEVOY, T.G. Manipulation of domestic animal embryo and implications for development. *Reprod. Dom. Anim.*, v.38, p.268-275, 2003.
- NEW, D.A.T. Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, v.53, p.81-122, 1978.
- NIBART, M., MARQUANT, B., HUMBLLOT, P. The application of new reproductive technologies in France. *Arq. Fac.Vet. UFRGS*, v.24, p.231, 1997.

- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., LEBFRIED-RUTLEDGE, M.L. et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.25, p.591-600, 1986.
- PEIXER, M.A.S., RUMPF, R., de BEM, A.R. et al. Produção de embriões e gestações a partir de ovócitos recuperados por ultra-sonografia em fêmeas super-ovuladas. *Arq.Fac.Vet.UFRGS*, v.24, p.231, 1996.
- PEREIRA, D.C. Avaliação de diferentes sistemas de cultivo na produção in vitro de embriões bovinos. Brasília, Brasil: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2003, 60p. Dissertação.
- 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.
- PITT, J.A., CARNEY, E.W. Evaluation of various toxicants in rabbit whole embryo culture using a new morphologically-based evaluation system. *Teratology*, v.59, p.102-109, 1999.
- POPE, L., POPE, V.Z., BECK, L.R. Development of Babbon pre-implantation embryos to post-implantation stages in vitro. *Biol. Reprod.*, v.27, p.915-923, 1982.
- REED, W. A., SUH, T. K., BUNCH, T. D.; WHITE, K. L.. Culture of in vitro fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, buffalo rat liver (BRL) cells, or BRL-cell-conditioned medium. *Theriogenology*, v.45, p.439-449, 1996.
- REICHENBACH, H.D., LIEBLICH, J., BERG, U. et al. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. *J.Reprod.Fertil.*, v.95, p.363-370, 1992.
- SIRARD, M.A., DUFORT, I., VALLEE, M. et al. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reproduction*, v.61, p.117-129, 2003. Suppl.
- SIRARD, M.A., LAMBERT, R.D. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol. Reprod.*, v.33, p.487-494, 1985.
- STICE, S.L., KEEFER, C.L., MATTHEWS, L. Bovine nuclear transfer embryos: oocyte activation prior to blastomere fusion. *Mol.Repod.Dev.*, v.38, p.61-68, 1994.
- STOJKOVIC, M., BÜTTNER, M., ZAKHARTCHENKO, V. et al. Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture: comparison of in vivo derived, in vitro produced, nuclear transfer and demi-embryos. *Anim.Reprod.Sci.*, v.55, p.151-162, 1999.

- STRINGFELLOW, D.A., THOMPSON, M.S. Maintenance and development of bovine embryos in vitro. *Alabama Agricultural Experiment Station: Highlights of Agricultural Research*, v. 33, p.11, 1986.
- SURANI, M.A., BARTON, S.C. Spatial distribution of blastomeres is dependent on cell division order and interactions on mouse morulae. *Devl. Biol.*, v.102, p.335-343, 1984.
- TALBOT, C., POWELL, A., GARRET, W. et al. Ultrastructural and karyotypic examination of in vitro produced bovine embryos developed in the sheep uterus. *Tissue Cell*, v. 32, p. 9–27, 2000.
- TAKAHASHI, M., KEICHO, K., TAKAHASHI, H. et al. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology*, v.54, p.137-145, 2000.
- THATCHER, W.W., GUZELOGLU, A., MATTOS, R. et al. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1435-1450, 2001.
- THIBODEAUX, J. K.; GODKE, R. A.. *In vitro* enhancement of early-stage embryos with co-culture. *Arch.Pathol.Lab.Med.*, v.116, p.364-371, 1992.
- VAN SOOM, A., BOERJAN, M.L., BOLS, P.E. et al. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biol.Reprod.*, v.57, p.1041-1049, 1997.
- 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. *Mol.Reprod.Dev.*, v.45, p.171-182, 1996.
- VAJTA, G., HYTTEL, P., TROUNSON, A.O. Post-hatching development of in vitro produced bovine embryos on agar and collagen gels. In: 14 th International Congress on Animal Reproduction; Stockholm, v.18, p.34, 2000a.
- VAJTA, G., MADDIX-HYTTEL, P., ALEXOPOULUS, N. et al. In vitro development of IVM/IVF bovine embryos cultured beyond 30 days in different protein sources. *Theriogenology*, v.55, p.344, 2001.
- VAJTA, G., ALEXOPOULUS, N., CALLESEN, H. Rapid growth and elongation of bovine blastocysts in vitro in a three-dimensional gel system. *Theriogenology*, v.7, p.1253-63, 2004.
- VIUFF, D., GREVE, T., AVERY, B. et al. Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination. *Biol.Reprod.*, v.63, p.1143-1148, 2000.
- VIUFF, D., HENDRIKSEN, P.J.M., Vos PLAM et al. Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in in vivo developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation. *Biol.Reprod.*, v.65, p.204-208, 2001.

- VIUFF, D., RICKORDS, L., OFFENBERG, H. et al. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biol.Reprod.*, v.60, p.1273-1278, 1999.
- WILMUT, I., HUNTER, R.H.F. Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in the oestrus. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.24, p.461-468, 1984.
- WILTBANK, M.C., GÜMEN, A., SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.21-52, 2002.
- WINTERS, L.M, GREEN, W.W., COMSTOCK, R.E. Prenatal development of the bovine. *Tech. Bull. Univ. Minn. Agric. Res. Sta.*, v.151, p.1-49, 1942.
- WLODARCZYK, B., BIERNACKI, B., MINTA, M. et al. Postimplantation whole embryo culture assay for hamsters: an alternative to rat and mouse. *Scientific World Journal*, v.1, p.227-234, 2001.
- WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., CARNWATH, J.W. et al. Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. *J.Reprod.Fertil.*, v.112, p.387-398, 1998.
- WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., CARNWATH, J.W. et al. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol.Repod.Dev.*, v.53, p.8-18, 1999.
- WRENZYCKI, C., WELLS, D., HERRMANN, D. et al. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol.Reprod.*, v.65 , p.309-317, 2001.

3. TEMA

O estabelecimento de um sistema de cultivo in vitro para embriões bovinos no período pós-eclosão e a simplificação da rotina com o uso de meios congelados prontos para uso são os temas centrais deste trabalho.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Os objetivos deste trabalho são de estabelecer um sistema de cultivo in vitro que permita o monitoramento do desenvolvimento de embriões produzidos in vitro no período pós-eclosão, e a implementação de técnicas de simplificação da rotina de produção in vitro de embriões bovinos.

4.1. Objetivos Específicos

1. Estabelecer um sistema de cultivo para embriões bovinos no período pós-eclosão, que proporcione a sobrevivência e crescimento desses embriões.
2. Avaliar a morfologia durante o desenvolvimento dos embriões pós-eclosão cultivados no sistema in vitro a ser testado.
3. Avaliar o efeito da criopreservação dos meios de maturação e cultivo prontos para uso sobre a produção blastocistos.

CAPÍTULO 2

**Desenvolvimento Pós – Eclosão:
um novo sistema de cultivo in vitro de embriões
bovinos**

Desenvolvimento Pós – Eclosão: um novo sistema de cultivo in vitro de embriões bovinos

Atualmente são obtidas na produção in vitro de embriões taxas de blastocisto aceitáveis. Apesar de todo o avanço, a taxa de concepção e gestação a termo foi estabilizada em um patamar que não apresenta avanço considerável e um número grande de perdas embrionárias é observado. Grande parte dessas perdas está concentrada no período inicial da gestação, quando ocorre o reconhecimento materno e implantação do embrião. Entretanto, os métodos que dispomos hoje não permitem a investigação aprofundada dos processos e fatores ocorrentes neste período. Tendo em vista este cenário, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias que permitam investigar o desenvolvimento e a diferenciação embrionária nesta fase para que o problema possa ser entendido e superado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de criar um sistema de cultivo estável que permitisse monitorar o desenvolvimento de embriões bovinos no período pós-eclosão.

Para isto, ovócitos provenientes de ovários de abatedouro foram maturados in vitro, fecundados (D0) e cultivados até D7, segundo o protocolo utilizado no laboratório do Danish Institute of Agricultural Sciences - Dinamarca (Holm et al., 1999; *Theorigenology*, v.52, p.683-700). Em D8, os embriões degenerados eram removidos do cultivo e era iniciada a adaptação ao meio de cultivo modificado, ao qual se submeteriam posteriormente (SOFaaci adicionado de 0,5% glicose e 10% soro fetal bovino). Em D11, os blastocistos eclodidos eram classificados e selecionados segundo o seguinte critério: Qualidade 1 (Q1: > 1.0 mm Ø, trofoblasto claro, massa celular interna compacta), Qualidade 2 (Q2: ≥ 0.5 mm Ø, poucos pontos negros no trofoblasto, massa celular interna menos compacta) ou Qualidade 3 (Q3: < 0.5 Ø, vários pontos negros distribuídos no trofoblasto, massa celular interna espalhada). Um total de 304 blastocistos de 12

manipulações foi utilizado no experimento. Os blastocistos D11 eram então depositados individualmente dentro de túneis de 15 mm x 1,2 mm \varnothing construídos com gel de agarose a 2,4% em PBS, suplementado com 5% (Agar5) ou 10% (Agar10) de soro fetal bovino. A placa com os túneis de gel permanecia imersa no meio de cultivo modificado e então incubada juntamente com os embriões em 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ a 38,5°C. As etapas principais de construção do sistema estão demonstradas no corpo desta tese (**Vide p.57**) e descritas detalhadamente no trabalho publicado na revista *Biology of Reproduction*, v.70, p.2048-2055, 2004 (**Vide p.58**).

A morfologia e comprimento dos embriões foram avaliados sob estereomicroscópio em D12, D13, D14 e D15. Em D14, parte dos embriões em cultivo (n=75) foram removidos do cultivo, biopsiados (1 mm) para testes de determinação do sexo e processados para posterior avaliação através de microscopias de luz e eletrônica de transmissão. Os dados qualitativos e quantitativos foram analisados através do teste do χ^2 e GLM (SAS Institute), respectivamente, com P no nível 0,05.

Os resultados revelaram que 170 embriões (56% do total) iniciaram o alongamento do trofoblasto quando cultivados dentro dos túneis. Esta porcentagem foi maior (LSmeans \pm SD, n=12; P<0.05) em Agar10 vs. Agar5 tanto para embriões Q1 (88 \pm 9 vs. 63 \pm 7), Q2 (66 \pm 7 vs. 48 \pm 5) ou Q3 (52 \pm 9 vs. 27 \pm 8). O comprimento médio dos embriões (mm; LSmeans \pm SEM) em D13 foi maior (P<0.05) em Q1 (2,1 \pm 0,2; n=49) e Q2 (1,7 \pm 1,4; n=98) do que Q3 (1,2 \pm 0,3; n=23). Em D14, os embriões Q1 (3,5 \pm 0,2) foram maiores (P<0.01) do que os embriões Q2 e Q3 (2,7 \pm 0,1 e 2,0 \pm 0,3). Em D15, os embriões Q1, Q2 e Q3 (4,4 \pm 0,5; n=24, 4,0 \pm 0,3; n=45 e 2,9 \pm 0,6; n=14, respectivamente) tiveram comprimento similar, provavelmente influenciado pelo baixo número de embriões Q3 restantes. A porcentagem de machos crescendo no sistema PHD foi maior (P<0.001) em Q1 (95%; n=40), mas similar em Q2 (39%; n=26) e Q3 (71%; n=7).

A microscopia de luz evidenciou a formação do hipoblasto e do epiblasto, sendo que este havia penetrado o trofoblasto (Camada de Rauber), definindo assim o disco embrionário. Em conclusão, este sistema de cultivo representa o primeiro modelo que proporciona crescimento rápido, associado ao alongamento e diferenciação inicial de embriões bovinos no período pós-eclosão.

Além do sistema PHD proposto da forma que se encontra nesta tese, outros substratos e ensaios paralelos foram realizados durante o período experimental. Apesar destes substratos e modelos diferenciados não terem sido utilizados na publicação, o relato destas tentativas deve ficar registrado e estão também apresentados nesta tese (**Vide p.66**).

Depois de definido o sistema PHD, alguns trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de testar sua validade, introduzindo-o como recurso investigativo adicional em ensaios e pequenos experimentos.

O primeiro deles surgiu com o desencadeamento de um evento inesperado no laboratório DIAS. Durante algumas semanas, os embriões destinados aos experimentos do sistema PHD, não conseguiam evoluir de forma satisfatória depois de D8-D9, apresentado baixa taxa de eclosão e elevado grau de degeneração, apesar de visualmente parecerem normais em D7. O problema foi investigado, e depois de algumas manipulações foi descoberto que o óleo de parafina utilizado na rotina havia adquirido elevado grau de toxicidade. Os dados deste experimento foram analisados e publicados em forma de resumo no *19th Congress of the AETE, Rostock, Germany (2003)* e estão aqui apresentados (**Vide p.71**).

Tendo em vista que vários embriões foram gerados neste experimento, tornou-se oportuno testarmos o comportamento dos mesmos no sistema PHD. Com o uso do PHD, pudemos observar que os embriões gerados em óleo de parafina tóxico, apesar de

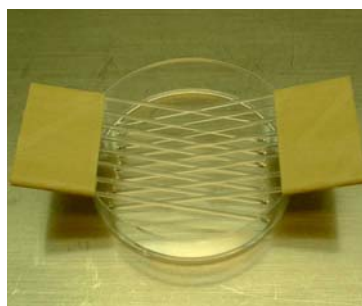
parecerem normais em D7, apresentavam uma série de anormalidades de desenvolvimento, representados principalmente por baixa taxa de alongamento e múltiplas áreas escuras indicativas de um processo degenerativo. Este experimento gerou dados interessantes que reforçaram o potencial de utilização do sistema PHD no monitoramento da rotina e sua capacidade de demonstrar a viabilidade inerente ao embrião. Os resultados deste experimento (*dados não publicados oficialmente*) estão relatados nesta tese (**Vide p.74**).

Etapas na construção do Sistema Post-Hatching

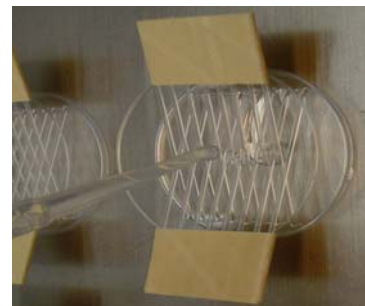
Etapa 1) Construção do gel de agarose



1- Construir os pentes de vidro, limpar em etanol e flambar.



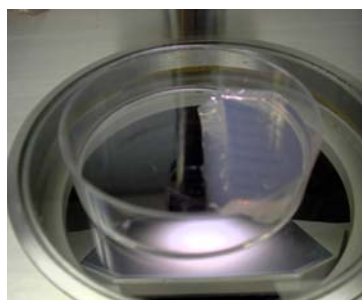
2- Colocar 2 pentes em direções opostas na placa de Petri.



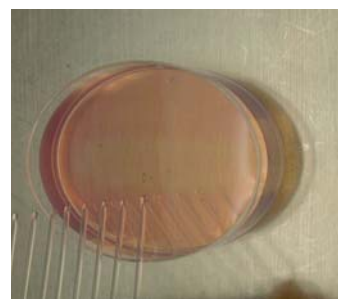
3- Colocar o gel autoclavado ainda aquecido sobre os pentes.



4- Remover pentes e o excesso de gel com lâmina de bisturi.

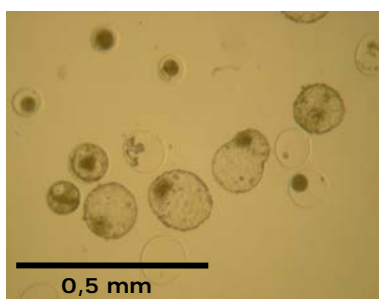


5- Deixar um gel de 8 túneis por placa.



6- Lavar e manter na solução de cultivo final (meio PHD).

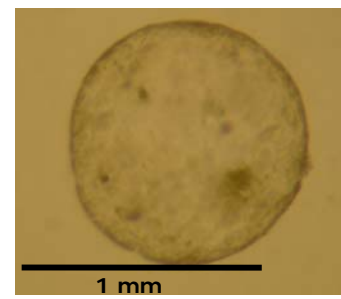
Etapa 2) Preparação dos embriões



1- Em D8 observar a eclosão dos embriões.

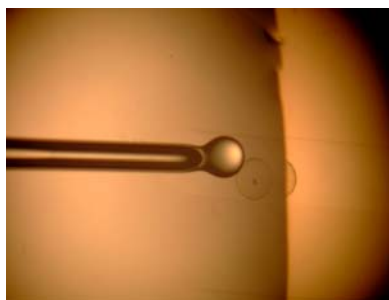


2- Em D9 os embriões são colocados em 50% de meio PHD.

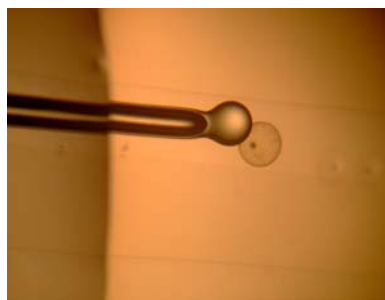


3- Em D11 os embriões estão prontos para ir para o cultivo no PHD System.

Etapa 3) Colocar os embriões no cultivo pós-eclosão (PHD System)



1- Empurrar o embrião para o interior do túnel com a ponta de uma pipeta Pasteur modificada.



2- Prosseguir com o embrião até o centro do túnel.



3- Deixar o embrião na parte central do túnel e deixar em cultivo.

Dados não publicados**Ensaio de outros substratos testados no Post Hatching Development (PHD) System**

Outros substratos, que não somente o gel de agarose foram investigados durante o processo de criação do PHD System. Estas tentativas devem ser ainda mais exploradas, tendo em vista que forneceram boa qualidade de informações e observações interessantes.

Substrato 1 - Matriz de colágeno reconstituído

O colágeno é um elemento estrutural fundamental na sustentação das camadas celulares fazendo parte integrante de todos os ambientes orgânicos ao qual o embrião e posteriormente o feto, estará exposto em todo seu desenvolvimento. Durante o desenvolvimento embrionário inicial, sabe-se que a interação entre células embrionárias e o endométrio é fundamental, e para isso, diferentes tipos de substâncias presentes no endométrio, dentre elas a laminina e o colágeno, participam ativamente dos processos de ligação e implantação do embrião (MacIntyre et al. 2002).

O colágeno puro é utilizado com sucesso para revestir o fundo da placa de cultivo de embrião em alguns sistemas PIV (Peura T.T. *Cloning Stem Cells*, v.1, p.13-24, 2003; Hyttel et al., 2002). Neste sentido, foi proposta a construção de um sistema de manutenção do desenvolvimento embrionário utilizando-se colágeno reconstituído como base (Vajta et al., 2000a; Alexopoulos 2001). O colágeno utilizado neste experimento foi extraído de caudas de camundongo como comumente descrito em diversos protocolos. Foi observado neste ensaio que o colágeno puro reconstituído não tem consistência para a construção de uma estrutura sólida e tubular (Figura 1) que permita o alongamento e normal crescimento para o embrião.

Substrato 2 - Matriz de colágeno combinado com ágar gel

O objetivo deste pré-experimento foi de utilizar-se ainda o colágeno, mas em combinação com o gel de agarose em uma proporção de 50% para que a consistência do gel permitisse a construção dos túneis. Entretanto, a consistência foi ainda muito frágil, impedindo a manipulação necessária do gel (Figura 2).

Substrato 3 - Gel de agarose combinado com células do oviduto

Sabe-se que a participação dos componentes ativamente secretados ou excretados no ambiente uterino é fundamental para o desenvolvimento contínuo do embrião e da gestação. As células do oviduto encontram-se dentre estes diferentes tipos celulares, sendo reconhecidas suas funções na maturação ovocitária e desenvolvimento embrionário. Seria mais compatível que para embriões pós-eclosão, a utilizada fosse proveniente do endométrio e não mais ao oviduto. Entretanto, as células endometriais são de difícil isolamento, com limitações de crescimento e fragilidade de sustentação quando isoladas para cultivo *in vitro*. Por estes motivos, as células do oviduto foram utilizadas neste pré-experimento. Neste modelo o uso das células do oviduto foi testado de duas maneiras: células incluídas no gel de agarose, ou apenas revestindo o túnel de cultivo do embrião pós-eclosão. A inclusão das células no gel parece ter impedido seu desenvolvimento, sendo este procedimento abandonado. Por outro lado, foi obtido sucesso no revestimento dos túneis com células do oviduto (Figuras 3 e 4). Mas o procedimento não se mostrou sempre reproduzível, requerendo tempo excessivo e habilidade que inviabilizariam a utilização do sistema. Além disto, grande parte dos revestimentos é removida no momento em que os embriões eram posicionados dentro do gel.

Substrato 4 - Gel de agarose combinado à solução BD Matrigel™

O BD Matrigel™ Matrix é um solubilizado de membrana extraído das células do Sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), um tumor de camundongos rico em proteínas de matriz extracelular (ECM). Seus componentes principais são as lamininas, seguidas por colágeno IV, proteoglicanas e endactin (BD Biosciences; www.bdbiosciences.com). Sabe-se que a implantação, o desenvolvimento embrionário e continuidade da gestação em bovinos dependem da interação entre células embrionárias e o endométrio, e esta integração é intermediada por componentes da ECM, dentre as quais as lamininas e o colágeno IV têm importância destacada (MacIntyre et al. 2002). Neste sentido, um pré-experimento foi realizado com o objetivo de testar se o revestimento dos túneis com Matrigel teria efeito positivo sobre o cultivo pós-eclosão, mimetizando a interação trofoblasto-endométrio que ocorreria *in vivo*. Foi observado o alongamento dos embriões nos túneis revestidos com Matrigel, entretanto, diversas regiões circulares sem células foram visualizadas no trofoblasto (Figuras 5 e 6). Estas constatações indicaram que a presença do Matrigel não impede o crescimento do embrião pós-eclosão, mas as anormalidades no trofoblasto indicam que seu uso deve ser mais investigado e metuculoso.



Figura 1– Fragilidade do gel de agarose combinado com colágeno reconstituído.

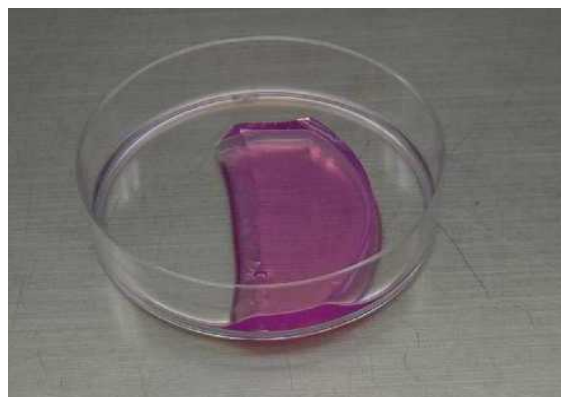


Figura 2 – Gel de agarose combinado com colágeno.



Figura 3 – Túnel de gel de agarose com 10% de SFB revestido com células do oviduto.

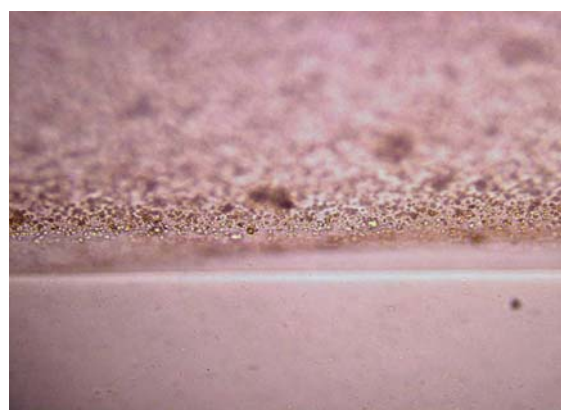


Figura 4 – Visualização aproximada do túnel de gel de agarose revestido com células do oviduto.



Figura 5 – Embrião D13 em desenvolvimento dentro do túnel de gel de agarose revestido com Matrigel.

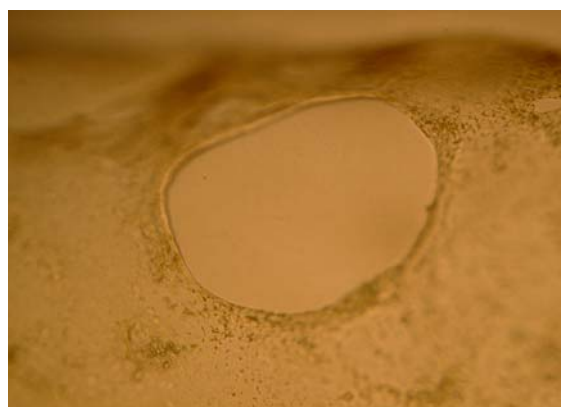


Figura 6 – Detalhe da região do trofoblasto com ausência de células, quando em crescimento no túnel de gel de agarose revestido com Matrigel.

Sistema de gaseificação para manutenção dos sistemas de cultivo

Para evitar a alteração brusca do pH das soluções de cultivo enquanto os embriões eram avaliados, foi criado um sistema simples de gaseificação (5% CO₂ e 20% O₂). O gás originado dos cilindros externos percorria um sistema comum de mangueiras de silicone, passava por um Becker contendo água destilada e era direcionado para o interior da câmara de acrílico (Figura 9). Este cuidado certamente contribuiu muito para o sucesso dos experimentos, e deve ser encarado como imprescindível para o sucesso do cultivo pós-eclosão quando o sistema PHD for utilizado.



Figura 9- Sistema de gaseificação (5% CO₂ em ar) e recipiente de umidificação para manutenção das placas de cultivo durante as análises dos embriões cultivados no sistema PHD.

19th Congress of the AETE - Association Europeenne de Transfert Embryonnaire (European Embryo Transfer Association), Rostock, Germany, 2003.[Abstract]

**Paraffin oil in in vitro embryo production:
One routine component, a sudden toxic agent**

BRANDÃO, D.O., PEDERSEN, A., VAJTA, G., CALLESEN, H.

Section of Reproductive Biology, Department of Animal Breeding and Genetics,

Danish Institute of Agricultural Sciences, 8830, Tjele, Denmark

1. Introduction

Trouble-shootings are often needed in routine systems for *in vitro* embryo production. In our *in vitro* system (Holm et al., 1999; *Theriogenology*; 52, 683-700) a slow decrease in blastocysts rates was experienced over a period of 6 months (Fig. 1), limiting embryo production. Many factors may be responsible for compromised results, including water chemicals, gases and toxic fumes, temperature, light, etc. The oil used for covering the media is known as a potential toxicity risk. The toxic effects are related to the source of oil and storage conditions, but the mechanisms are not clearly understood (Van Soom et al., 2001; *Reprod. Dom. Anim.*, 36: 169-176).

2. Materials and Methods

Among other factors, the currently used paraffin oil was tested. For that, three sources of oil stored at the same conditions in the lab were compared: paraffin oil batch 221 (currently in use, 6 months old; Merck), paraffin oil batch 238 (3 months old; Merck) and mineral oil embryo tested lot 21K0038 (2 years old; Sigma). Bovine oocytes derived from abattoir were matured, fertilized (Day 0) and cultured following the routine protocols,

using the same oil for all three phases. Blastocyst rates were determined and compared on Days 7, 8 and 9. The data was analyzed by Genmod-Procedure (SAS Institute Inc.). Results of 4 replicates are presented in Table 1.

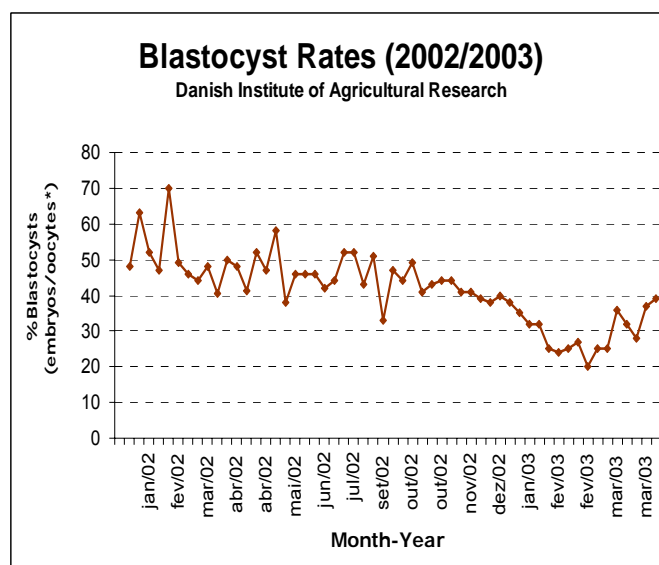


Figure 1 – Average rates of bovine blastocyst (%) production over a period of 18 months in the Danish Institute of Agricultural Sciences

Table 1. Blastocysts rates (mean \pm SEM) on Day 7, Day 8 and Day 9 under, when matured, fertilized and cultured using different oil sources.

Oil source	No. of Oocytes	Blastocysts/oocytes (%)		
		Day 7	Day 8	Day 9
Paraffin oil 221	305	11 \pm 4 ^{a,x}	8 \pm 4 ^{a,x}	4 \pm 2 ^{a,y}
Paraffin oil 238	218	26 \pm 2 ^{b,x}	19 \pm 3 ^{b,xy}	15 \pm 2 ^{b,y}
Mineral oil	210	39 \pm 4 ^{c,x}	42 \pm 9 ^{c,x}	37 \pm 18 ^{c,x}

^{a,b,c} Differences within columns ($P < 0.01$); ^{x,y,z} Differences within rows ($P < 0.05$)

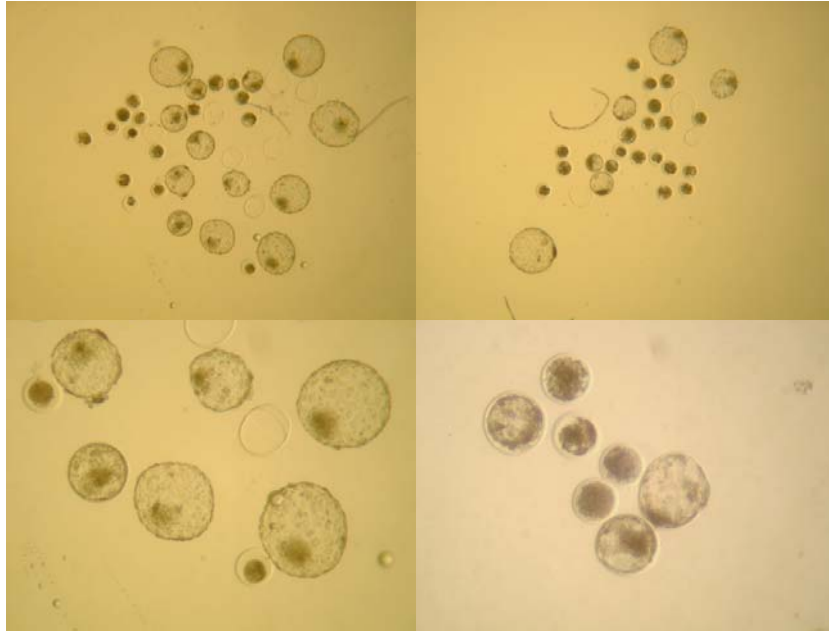


Figure 2 – Bovine embryos cultured under mineral oil (A) and toxic paraffin oil (B).

2. Results and conclusion

The results show higher blastocyst rates under mineral oil, which were stable from Day 7 until Day 9. Furthermore, the blastocysts in the mineral oil group had superior morphology when evaluated through stereo microscope, with clearer and brighter cytoplasm compared with the ones cultured under both paraffin oil batches.

Based on these results, and as paraffin oil has been successfully used for several years in our lab, we presume that besides storage conditions, batch and age of the oil, unknown factors may act differently according to the source of oil. Hence, we suggest that that oil should be always considered and investigated as a potential cause of toxicity, acting either in a slight and almost not detectable way or as a drastic collapse cause in the *in vitro* production system, independent of its previous performance.

Dados não publicados

Uso do sistema PHD para monitoramento do desenvolvimento avançado de embriões bovinos previamente cultivados sob óleo mineral tóxico

BRANDÃO, D.O., PEDERSEN, A., VAJTA, G., CALLESEN, H.

*Section of Reproductive Biology, Department of Animal Breeding and Genetics,
Danish Institute of Agricultural Sciences, 8830, Tjele, Denmark*

1. INTRODUÇÃO

Durante alguns meses, os resultados de desenvolvimento dos embriões no PHD System tornaram-se bastante insatisfatórios, com menores nas taxas de sobrevivência à eclosão (D8-D9) e redução na velocidade de crescimento e alongamento do trofoblasto. Os poucos embriões que com alongamento satisfatório, apresentavam trofoblasto extremamente escuro, com diversas áreas com aglomerados celulares semelhantes a necroses. Paralelamente, duas observações importantes foram constatadas na rotina do laboratório do DIAS: 1) insucesso na produção de embriões clonados pela técnica HMC; 2) insucesso na produção in vitro de embriões suínos. Já na produção in vitro de embriões bovinos não foi observada uma redução brusca das taxas de blastocisto, mas sim intermitente. Devido a experiências semelhantes ocorridas na rotina do laboratório da Embrapa-Cenargen, bem como relatos de literatura (Van Soom, et al., 2001; Shimada et al. 2002) foi sugerido que o óleo mineral utilizado no cultivo fosse investigado como possível causa da redução nos resultados de produção. Diferentes tipos de óleo foram comparados e as taxas de blastocisto (D7) analisadas. Este trabalho foi apresentado na forma de resumo apresentado no *19th Congress of the AETE - Association Europeenne de Transfert Embryonnaire (AETE), Rostock, Germany, 2003*, e concluiu que o óleo de parafina (Merck) utilizado para no cultivo há vários meses, tornou-se deletério ao

desenvolvimento embrionário. Com o objetivo de documentar os efeitos tóxicos tardios sobre o desenvolvimento embrionário, os embriões originados dos diferentes tipos de óleo continuaram o cultivo no PHD System após D9 e estão demonstrados neste ensaio experimental.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os embriões produzidos no experimento anterior foram colocados em cultivo no PHD System e seu desenvolvimento foi acompanhado. Dos 30 embriões D9 originados do óleo de parafina partida 238 (tóxico), apenas 15 sobreviveram até D11 e puderam ser levados ao cultivo pós-eclosão, e dos 72 embriões D9 originados do óleo mineral, 65 foram levados ao cultivo pós-eclosão no sistema PHD. As taxas de embriões capazes de alongamento e a morfologia dos embriões foram analisadas, sendo que alguns foram fixados e corados em hematoxilina-eosina (HE) e avaliados por microscopia de luz.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento dos embriões originados do óleo de parafina foi baixo, com apenas 5 embriões (n=15) atingindo alongamento superior a 0,5 mm até D14. Os embriões alongados apresentaram ainda diversos sinais de alteração do trofoblasto, com extensas áreas de aglomerados de células, de aparência semelhante a necroses (Fig.1, 2, 3 e 4). Nestes embriões não foi possível a identificação da região exata correspondente ao disco embrionário. Por outro lado, 36 embriões (n=72) provenientes de cultivo sob o óleo mineral tiveram alongamento superior a 0,5mm, sendo que 15 atingiram alongamento superior a 1 mm até D14. (Fig.5 e 6). O trofoblasto destes embriões apresentou-se claro e com aglomerados celulares escassos e pouco aparentes à microscopia de luz.

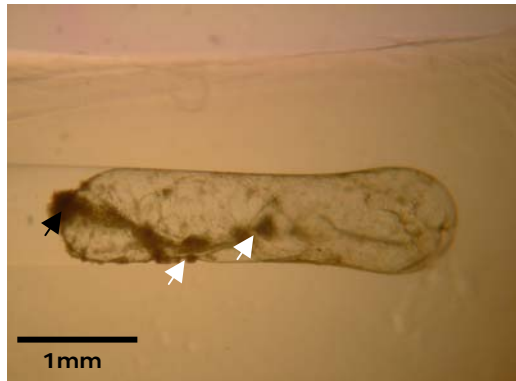


Figura 1- Embrião D13 proveniente de cultivo sob óleo tóxico. As setas indicam regiões de alteração no trofoblasto.

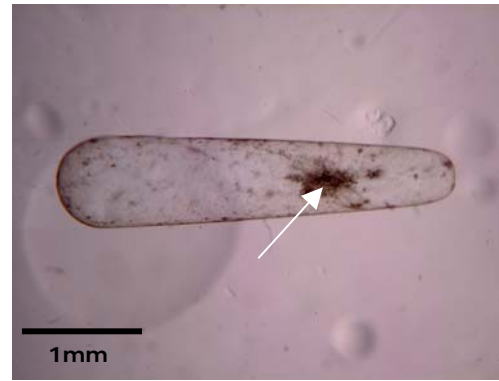


Figura 2- Embrião D14 proveniente de cultivo sob óleo tóxico. A seta indica a região do disco embrionário alterada.

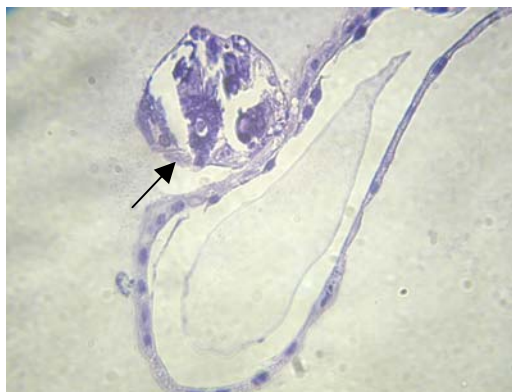


Figura 3- Corte histológico corado em HE de uma região com aglomerado celular (seta) de embrião D14 proveniente de cultivo sob óleo de parafina tóxico.



Figura 4- Corte histológico corado em HE da região do disco embrionário (setas) de embrião D14 proveniente de cultivo sob óleo de parafina tóxico.

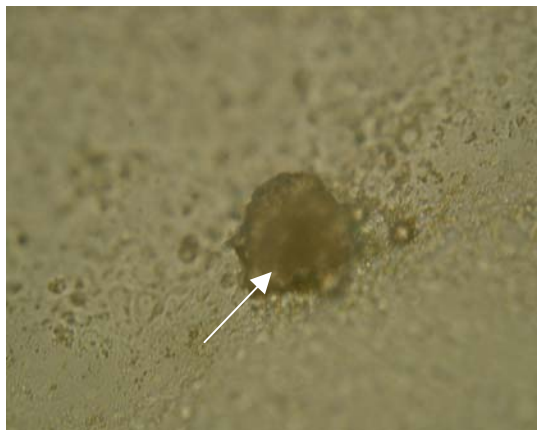


Figura 5- Região com aglomerado celular no trofoblasto de embrião D14 proveniente de cultivo sob óleo mineral normal.

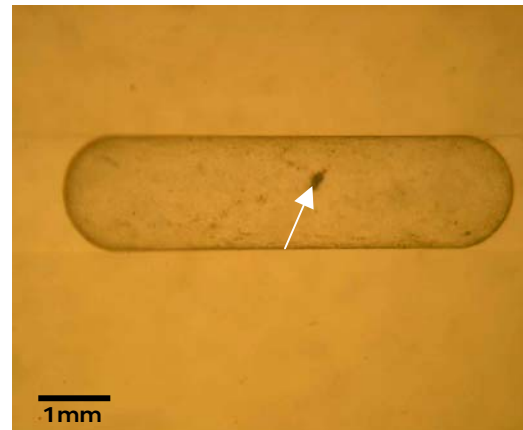


Figura 6- Embrião D14 proveniente de cultivo sob óleo mineral normal. A seta indica a possível região do disco embrionário.

Os resultados apresentados neste ensaio não só identificam o baixo desenvolvimento inicial dos embriões provenientes de um sistema de cultivo conhecidamente tóxico, mas também ilustram os efeitos deste cultivo sobre o desenvolvimento tardio dos embriões (D14). Estes resultados reforçam a hipótese de que o sistema de cultivo in vitro pode afetar o desenvolvimento embrionário de forma significativa em estágios mais avançados do que os normalmente avaliados como taxas de blastocisto (D7). Além disto, reportamos aqui a possibilidade de utilização do sistema PHD como forma de avaliação complementar dos sistemas de produção in vitro de embriões, contribuindo assim com informações antes pouco acessíveis.

CAPÍTULO 3

Criopreservação de meios prontos para uso

Meios congelados prontos para uso: simplificando a rotina na produção in vitro de embriões bovinos

O congelamento e estoque de meios prontos para uso na produção in vitro (PIV) de embriões, incluindo hormônios e proteínas pode resultar em considerável avanços no que se refere a racionalização, redução de custos e consistência de resultados obtidos na rotina. Apesar da hipótese do processo de congelamento alterar as propriedades do meio, nenhuma investigação sistemática e comparativa do assunto foi oficialmente divulgada até o momento.

Diante deste cenário, este trabalho objetivou comparar as taxas de blastocistos produzidos em meio novo ou congelado, e em dois sistemas de PIV diferentes (DIAS-Dinamarca e Embrapa-Brasil). A influência do tempo de estoque também foi investigada nos sistemas de produção da Dinamarca ao comparar-se o uso de meio fresco ou meio congelado por 8 semanas, sobre as taxas de blastocisto. Para tanto, alíquotas de 2 ml de meio final de maturação (MIV) e de meio final de cultivo (SOFaaci) foram congelados e estocados em freezer -80°C . Para uso, as alíquotas foram descongeladas *overnight* em refrigerador a $4-5^{\circ}\text{C}$, sendo todos os meios equilibrados a 39°C and $5\% \text{CO}_2$ em atmosfera umidificada. Foram utilizados nos experimentos, ovócitos de abatedouro que foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos: Grupo 1 (MIV novo, SOFaaci novo), Grupo 2 (MIV congelado, SOFaaci novo), Grupo 3 (MIV novo, SOFaaci congelado) e Grupo 4 (MIV congelado, SOFaaci congelado).

As taxas de produção de blastocisto (LSM \pm SD) nos 4 grupos investigados nos sistemas de produção da Dinamarca e Brasil (Dinamarca; Brasil) foram, respectivamente Grupo 1 (40 ± 7 , $n=500$; 50 ± 5 , $n=169$), Grupo 2 (43 ± 10 , $n=259$; 50 ± 12 , $n=167$), Grupo

3 (38 ± 7 , $n=366$; 48 ± 9 , $n=168$) and Grupo 4 (37 ± 6 , $n=368$; 46 ± 10 , $n=168$). Segundo os dados coletados, não houve diferenças nas taxas de blastocisto entre os grupos, assim como nenhuma alteração do aspecto morfológico foi observada sob estereomicroscópio. No sistema da Dinamarca, não foram encontradas também diferenças entre os grupos que utilizaram os meios congelados e estocados por 8 semanas, sendo Grupo 1 (32 ± 5 , $n=589$), Grupo 2 (34 ± 8 , $n=606$), Grupo 3 (30 ± 6 , $n=359$) e Group 4 (35 ± 4 , $n=578$).

O trabalho, apesar de conter somente resultados de taxa de blastocisto, indicou que a utilização do meio congelado da produção in vitro parece não ter efeito deletério sobre o embrião gerado tanto na MIV quanto no SOFaaci, independente do sistema de produção testado e do tempo de estoque. Entretanto, nenhum teste mais profundo sobre a viabilidade destes embriões foi contemplado neste trabalho.

Considerando-se que o sistema PHD estava já estabelecido, foi realizado um ensaio experimental utilizando-se o sistema PHD como método de investigação de alguns dos embriões gerados em meio congelado. Realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa, este ensaio englobou as duas tecnologias desenvolvidas nesta tese, ilustrando de maneira prática, a possibilidade e limitações de ambas. Os resultados encontrados neste ensaio alertam que apesar dos embriões produzidos em meios congelados terem aspecto normal, eles podem ter componentes inerentes alterados, como a expressão gênica. Estas investigações, entretanto, precisam ser aprofundadas e trabalhadas em volume mais considerável, para que o uso do congelamento de meios seja validado como seguro para a biotecnologia de embriões.

Trabalho sob revisão na revista *Theriogenology*

Title: Ready-to-use frozen media: simplifying the routine for bovine in vitro embryo production

Running title: Frozen media for embryo in vitro production

Authors: Daniela Oliveira Brandão^{1,3}, Gábor Vajta², Anette M. Pedersen², Daniela Costa Pereira¹, Rodolfo Rumpf¹, Henrik Callesen²

¹Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, Brasília-DF, Brazil.

²Section of Population Genetics and Embryology Reproductive Biology, Department of Genetics and Biotechnology, Danish Institute of Agricultural Sciences, DK-8830, Tjele, Denmark.

³Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília-DF, Brazil.

Corresponding author:

Daniela Oliveira Brandão

Adress: SQN 106, Bloco K, Apt 501

CEP: 70000-000

Brasília-DF, Brazil

E-mail: daniela.brandao@uol.com.br

Phone: + 55 61 3435 4698

Abstract

Freezing and stocking ready-to-use media for in vitro embryo production (IVP) including hormones and protein supplementation may result in considerable advancement towards rationalization, cost-reduction and consistency. Although freezing supposedly alters media, no systematic comparative investigation has been published so far. In the present work, blastocyst rates of bovine embryos produced in fresh or frozen/thawed media were compared in two different IVP systems (Danish and Brazilian). Time influence was also investigated by using 8 weeks stored medium (DIAS) for embryo production. Two ml aliquots of final maturation (IVM) and culture (SOF) medium were frozen and stored at -80°C. Thawing was performed overnight at 4-5°C and all media were equilibrated at 39°C and 5% CO₂ in humidified air prior to use. Abattoir-derived oocytes were randomly distributed into 4 groups: Group 1 (fresh IVM, fresh SOF), Group 2 (frozen IVM, fresh SOF), Group 3 (fresh IVM, frozen SOF) and Group 4 (frozen IVM, frozen SOF). Day 7 blastocyst rates (LSM ± SD) in the four groups and in the Danish and Brazilian systems, respectively, were as follows; Group 1 (40 ± 7, n=500 ; 50 ± 5, n=169), Group 2 (43 ± 10, n=259 ; 50 ± 12, n=167), Group 3 (38 ± 7, n=366 ; 48 ± 9, n=168) and Group 4 (37 ± 6, n=368 ; 46 ± 10, n=168). No differences between groups were found in blastocyst rates or in the stereomicroscopic view of the embryos. In the 8 weeks stored medium no differences were also found among Group 1 (32 ± 5, n=589), Group 2 (34 ± 8, n=606), Group 3 (30 ± 6, n=359) and Group 4 (35 ± 4, n=578). The applied medium freezing procedure seems to be harmless in two independent systems for both IVM and IVC media, regardless storage time. In conclusion, the use of frozen ready-to-use media should be considered as a new possibility to decrease costs and increase consistency of bovine in vitro embryo production.

Keywords: cattle, maturation, culture, freezing, development

Introduction

During the past decades, in domestic animal embryology efforts were mainly focused to improve efficiency of in vitro embryo production as well as to increase pregnancy and calving rates. Considerably less attention was paid to simplify and rationalize the related laboratory routines. This tendency is in a sharp contrast with other fields of laboratory work, where simplification is a constant goal and has been built into the procedures for example by aliquoting and freezing final working solutions. In embryology, the routine practice includes freezing of some stocks and components (for example sera or hormones), 4°C storage of some solutions for a limited period (months or weeks) and weekly production of final media used for IVM and IVC. This routine means considerable loss regarding time, work and the amount of expensive chemicals used in excess at all level (solutions and final media). Additionally, new media require endless testing and/or mean a persistent source of inconsistency through the new lots of chemicals and water used for preparation and the potential failure at measurements and production. This routine has been established and is practiced according to the common belief (reflected also by the protocols used worldwide) that freezing decreases considerably the biological value of media used during the embryo production procedures. Few papers dealing with the complex dynamics of freezing solutions and its relation with cells membranes confirm that substances in the final composition of the thawed solution, especially serum composition, may be altered [[1, 2, 3]. However, with the proper rate of cooling and warming and the optimal storage temperature these problems can be minimized or entirely eliminated [4, 5].

According to our knowledge, no comparative work investigating the effect of long-term storage of ready-to-use media supplemented with hormones and proteins has been published so far. The purpose of our work was to investigate the in vitro effect of aliquoted deep frozen final IVM and IVC media in two different IVP systems used in two laboratories of two countries, Brazil and Denmark, by using weekly prepared media as controls and Day 7 blastocyst rates for evaluation.

Materials and Methods

Unless otherwise indicated, all chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Freezing, storage and thawing of media

The method used for freezing, storage and thawing of IVM and IVC media were identical in both laboratories. A total of 50 ml of final IVM and 50 ml of final IVC media (i.e. hormones and sera) were distributed in 2 ml aliquots in 10 ml conical plastic tubes (Corning Inc., New York, USA) and placed in -80°C freezer. This source of frozen medium was used throughout all replicates during the experiments. One to 3 days before use, frozen media were placed at 4-5°C and stored there for minimum 12 h for thawing. At 4 to 24 h before use, media were distributed in the culture dishes (see described later) and equilibrated at 39°C and 5% CO₂ in air and maximum humidity.

Experimental groups

The same experimental design was used throughout all replicates. Selected cumulus-oocytes complexes (COCs) were randomly distributed into 4 groups and treated accordingly: Group 1 (fresh IVM, fresh IVC), Group 2 (frozen IVM, fresh IVC), Group 3 (fresh IVM, frozen IVC) and Group 4 (frozen IVM, frozen IVC). Blastocysts rates were recorded under a stereomicroscope on Day 7 of culture. In all experiments, the medium was stored for at least one week before use. To investigate if time storage would influence in the medium efficiency, the same medium bath was thawed and used for IVP (DIAS) only after several weeks of storage.

Experiment 1: Ready-to-use medium in the Danish IVP system

The first experiment was performed the Danish Institute of Agricultural Sciences (DIAS, Tjele, Denmark). Method used for bovine IVP was described earlier [6]. Briefly, bovine ovaries were obtained in a local abattoir and were transported to the laboratory in 0.9% NaCl-solution (Pharmacia AS, Copenhagen, Denmark), penicillin (100 UI/ml) and streptomycin (5 mg/ml) at 30°C. The COCs were aspirated with a 19-g needle from follicles with 2 to 8 mm diameter and washed in HEPES-buffered TCM-199 solution supplemented with 1% cattle serum (CS; Danish Veterinary Institute, Frederiksberg, Denmark). The selected COCs were transferred to 4-well dishes (Nunc, Roskilde,

Denmark) in groups of 25-30 oocytes per well containing 400 μ l IVM medium (bicarbonate-buffered TCM-199 supplemented with 10 IU/ml eCG, 5 IU/ml hCG; Suigonan[®], Intervet Scandinavia, Skovlunde, Denmark; and 15% CS) covered by 400 μ l mineral oil. Dishes were incubated for 22 h at 39°C and 5% CO₂ in air at maximum humidity. Subsequent fertilization was performed in modified Tyrode's medium [7] with frozen-thawed sperm of a Danish Holstein-Friesian bull of proven fertility. After 21-22 h co-incubation, cumulus cells were removed from the presumptive zygotes by vortexing with maximum speed. Embryos (maximum 30 per well) were then cultured for 7 days in 400 μ l of IVC medium consisting of SOFaaci [6] supplemented with 5% CS covered by 400 μ l mineral oil at 39°C in 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ and maximum humidity.

Stocking time influence

In Experiment 1, we also argued whether time storage would interfere with medium composition and alter embryo development and blastocyst rates. To investigate that, the experiment was performed in two rounds: one week storage (first round) and 8 weeks storage (second round), using the same medium bath for both rounds. The maturation, fertilization and culture conditions were precisely the same described previously.

Experiment 2: Ready-to-use frozen medium in Brazilian IVP system

Experiment 2 was performed in the Laboratory of Animal Reproduction of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology (Brasilia, Brazil). In all treatment groups the IVP followed the procedure that has been described earlier in detail [8]. Briefly, ovaries from crossbreed cows (*Bos indicus* x *Bos taurus*) were collected in local abattoirs and transported to the laboratory in 0.9% NaCl-solution supplemented with penicillin G (100 IU/ml) and streptomycin sulfate (100 μ g/ml) at 30-32°C. The COCs were aspirated from 2 to 8 mm diameter follicles with a 18-g needle and washed in HEPES-buffered TCM-199 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The selected COCs were transferred to 60 x 15 mm Petri dishes (Corning Incorporated, New York, USA) containing 200 μ l drops (25-30 per drop) of IVM that consisted in bicarbonate-buffered TCM-199 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% FCS, 24 IU/ml LH, 10 μ g/ml FSH and antibiotics (100 IU/ml of penicillin and 50 μ g/ml of streptomycin) under silicone oil (Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA). Dishes were incubated for 22-24 h at 39°C and 5% CO₂ in air at

maximum humidity. Fertilization was performed in modified Tyrode's medium [7] with frozen-thawed sperm of a Nelore breed bull of proven fertility. After 18-20 h co-incubation, cumulus cells were partially removed with a narrow glass pipette. Presumptive zygotes were then placed in 200 μ l drops (maximum 30 per drop) of SOF consisting of SOFaaci medium [6] supplemented with 5% FCS covered by silicone oil and incubated at 39°C and 5% CO₂ in air and maximum humidity. On Day 2, embryos were gently set free from the cumulus investment that remained attached to the bottom of the dish. On Day 7 blastocyst rates were recorded under a stereomicroscope.

Statistical analysis

Blastocyst rates were compared by Genmod-Procedure (SAS Institute Inc.).

Results

Experiment 1.

Regardless the treatment group, blastocyst rates were similar ($P > 0.05$) in a one week stored frozen/thawed medium (Table 1). In Table 2 the results showed that blastocyst rates were also similar ($P > 0.05$) among groups when the medium was stored for a minimum 8 weeks. In both rounds, the blastocysts consisted of clear trophectodermal cells and a well defined inner cell mass when analyzed under stereomicroscope.

Experiment 2.

In Experiment 2, blastocyst rates were similar ($P > 0.05$) in all treatment groups (Table 3) The stereomicroscopic characteristics of blastocysts were not different between treatment groups and were similar to those described in Experiment 1.

Discussion

The relatively fast freezing at -80°C and the slow thawing at $4-5^{\circ}\text{C}$ did not influence the general medium properties, no signs of precipitation and no color changes were observed. Blastocyst rates and blastocyst morphology in Experiment 1 and 2 were identical between the different groups regardless to any combination of fresh or frozen IVM and IVC media. It may suggest that the biological properties of media regarding the support of IVM and IVC did not change significantly. All these observations are in sharp contrast to our earlier (unpublished) experiments, where freezing to -20°C seriously compromised blastocyst rates and thawing produced a strong precipitation in the medium, and blastocyst rates in these media were seriously compromised. This precipitation may be related to some components present in the sera, including fibrin and other constituents already described (www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/c9676pis.pdf) for sera comprised.

Other components are possibly involved such as protein and minerals, but this is not confirmed. A recent report [9] has found that embryo production is compromised when frozen/thawed or lyophilized medium is used, however is not described the possible reasons for that In our protocol, the only observed change was that the color of frozen

media turned yellow in a week, but the normal color is entirely recovered when thawing is completed.

After confirming the efficacy of the frozen medium, we argued if time storage would be prejudicial. The similar blastocysts rates for the different groups when using of 8 weeks stored medium (Experiment 1) has indicated the viability of frozen/thawed media also in longer time storage. The general decrease of blastocyst rates observed in all groups (i.e. control group) in this experiment has indicated that other factors, but not medium freezing, were influencing embryo production. It is possible that 8 weeks is a short storage period, but was considered enough to represent the stability of the -80°C and to confirm that storage time would not be a limitation for the use of frozen medium. These data encourage the storage of the same medium bath for an entire experimental period, as a way to reduce the variations normally found in weekly or daily medium preparation.

The repeatability of the protocol in a different IVP system (Experiment 2), work conditions and oocyte source has confirmed that the proposed freezing method was efficient under diverse circumstances, and the different protein supplementation (CS vs. FCS) had no effect on the high blastocyst rates that were obtained with the frozen-thawed media.

In conclusion, freezing and stocking ready-to-use IVM and IVC media according to the applied procedure does not compromise blastocyst rates obtainable with fresh media, even in longer storage time. Although results of ongoing investigations on pregnancy and calving rates as well as further analyses of the produced embryos are needed to provide a final evidence of the value of this approach, the in vitro results are promising. The freezing, storage and thawing of aliquoted IVM and IVC media may significantly decrease the costs and work related to in vitro embryo production, and may help to decrease the variation in results.

Acknowledgements

The authors thank the excellent technical support from Ruth Kristensen and Klaus Villemoes.

References

- [1] Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 1970; 168: 939-49.
- [2] Wolfe J, Bryant G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology* 1999; 39: 103-29. [review]
- [3] Bausserman LL, Saritelli AL, Milosavljevic D. High-density lipoprotein subfractions measured in stored serum. *Clin Chem* 1994; 40: 1713-16.
- [4] Fahy GM. Cryoprotectant toxicity neutralizers reduce freezing damage. *Cryo-letters* 1983; 4: 309-14.
- [5] Arav A, Pearl M, Zeron Y. Does membrane lipid profile explain chilling sensitivity and membrane lipid phase transition of spermatozoa and oocytes? *Cryo-letters* 2000; 21: 179-86.
- [6] Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 1999; 52:683-700.
- [7] Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Lebfried-Rutledge ML, Cister ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25:591-600.
- [8] Pereira DC, Dode MAN, Rumpf R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 2005; 63: 1131-41.
- [9] De la Varga S, Diez C, Alvarez E, Fernandez A, Fernandez L, Carbajo M. Freezing and lyophilization as tools for long-term-storage of a bovine embryo culture medium. *Reprod Dom Anim* 2005; 40: 384 [abstract]

Table 1 – Blastocyst rates of bovine embryos produced in vitro from fresh or frozen IVM and/or SOF medium after one week storage in -80°C refrigerator (Danish IVP system).

Treatments	Oocytes (n)	Blastocysts (n)	Blastocyst rates (% \pm SD)
Fresh IVM/ Fresh SOF	500	195	40 \pm 7
Frozen IVM/ Fresh SOF	259	109	43 \pm 10
Fresh IVM/ Frozen SOF	366	137	38 \pm 7
Frozen IVM/ Frozen SOF	368	136	37 \pm 6

Table 2 – Blastocyst rates of bovine embryos produced in vitro from fresh or frozen IVM and/or SOF medium after 8 weeks storage in -80°C refrigerator (Danish IVP system).

Treatments	Oocytes (n)	Blastocysts (n)	Blastocyst rates (% \pm SD)
Fresh IVM/ Fresh SOF	589	186	32 \pm 5
Frozen IVM/ Fresh SOF	606	203	34 \pm 8
Fresh IVM/ Frozen SOF	359	107	30 \pm 6
Frozen IVM/ Frozen SOF	578	198	35 \pm 4

Table 3 – Blastocyst rates of bovine embryos produced in vitro from fresh or frozen IVM and/or SOF medium (Brazilian IVP system).

Treatments	Oocytes (n)	Blastocysts (n)	Blastocyst rates (% ± SD)
Fresh IVM/ Fresh SOF	169	87	50 ± 5
Frozen IVM/ Fresh SOF	167	83	50 ± 12
Fresh IVM/ Frozen SOF	168	83	48 ± 9
Frozen IVM/ Frozen SOF	168	77	46 ± 10

XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Barra Bonita, SP, p. 127, 2004.

Congelamento e estoque de meios prontos para uso:

A rotina simplificada da PIV de embriões bovinos

Brandão, D.O.¹; Pereira, D.C.²; Dode, M.A.N.³; Rumpf, R.³

¹ Universidade de Brasília–UnB/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária–FAV, 70910-900, Brasília-DF, Brasil; ² Universidade de Brasília–UnB/ Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, Brasília-DF, Brasil; ³ EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, 70770-900, Brasília-DF, Brasil.

Introdução

A rotina da produção *in vitro* (PIV) de embriões exige uma crescente racionalização de trabalho, tempo e constância de resultados, aliados a redução de custos para maior eficiência da técnica. Neste sentido, uma possibilidade interessante seria o estoque das soluções prontas para uso, já incluindo hormônios e soro bovino. Entretanto, este procedimento foi até o momento desencorajado por diminuir a eficiência dos componentes dos meios por hipoteticamente desnaturar proteínas e/ou precipitar minerais, levando a uma menor produção de embriões *in vitro*.

Objetivos

Este trabalho teve por objetivo comparar as taxas de blastocistos produzidos *in vitro* utilizando meios frescos (produzidos na semana) ou congelados e estocados antes do uso.

Materiais e métodos

Os meios de maturação (MIV, TCM 199 adicionado de hormônios, antibióticos, L-glutamina e 10% de soro fetal bovino) e cultivo (SOFaaci, Holm et al., 1999) foram aliquotados (2 ml), acondicionados em tubos plásticos de 15 ml e estocados em freezer a -80°C . O descongelamento (Fig. 1, 2 e 3) foi realizado *overnight* em geladeira de $4-5^{\circ}\text{C}$ e o meio estabilizado em estufa até 4 horas antes do uso. Ovócitos de vacas mestiças de abatedouro foram então coletados e distribuídos aleatoriamente em 4 grupos:

- MIV fresco, SOF fresco
- MIV congelado, SOF fresco
- MIV fresco, SOF congelado
- MIV congelado, SOF congelado

Os meios e procedimentos de maturação, fecundação e cultivo foram realizadas de acordo com a rotina do laboratório e as taxas de blastocisto (%) no dia 7 foram comparadas. Os dados de 5 réplicas foram analisados pelo método por Genmod-procedure (SAS Institute Inc.).



Figura 1 - Meio MIV congelado pronto para uso ou estoque.



Figura 2 - Meio MIV pronto para uso em descongelamento.



Figura 3 -Meio MIV descongelado pronto para uso.

Resultados

As taxas de blastocisto foram similares e os resultados estão apresentados na tabela 1.

Quando congelados os meios assumem coloração amarela, mas após o descongelamento nenhuma alteração de cor, pH ou precipitação foi observado. O aspecto morfológico dos embriões não diferiu entre os grupos.

Tabela 1 – Taxa de blastocistos produzidos *in vitro* utilizando meios de maturação (MIV) e/ou de cultivo (SOF) frescos ou congelados.

Tratamentos	Nº de ovócitos	Nº de blastocistos	Taxa de blastocistos (% ± SD)
MIV fresco/ SOF fresco	169	87	50 ± 5
MIV congelado/ SOF fresco	167	83	50 ± 12
MIV fresco/ SOF congelado	168	83	48 ± 9
MIV congelado/ SOF congelado	168	77	46 ± 10

Conclusão

Os resultados encontrados mostram que o congelamento dos meios, quando processados segundo o protocolo previamente descrito, não prejudica a qualidade e as taxas de blastocisto. Em conclusão, o uso de meios congelados deve ser considerado como uma nova alternativa para racionalização e uniformidade do trabalho, contribuindo para a redução de custos e maior eficiência na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Referências Bibliográficas

PEREIRA, D.C. *Avaliação de diferentes sistemas de cultivo na produção in vitro de embriões bovinos*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB, 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias).

Apoio financeiro: Embrapa / CNPq

Reproduction, Fertility and Development, v.16,,2005

**Effect of frozen media on Igf2 expression of bovine embryos
cultured entirely in vitro until Day 14**

Franco, M.M.¹, Brandão, D.O.^{1,2}, Pereira¹, D.C.¹, Mundim¹, T.C.D., Ávila, F.F.¹, Melo, E.O.¹, Dode, M.A.N.¹, Rumpf, R.¹

¹ Laboratory of Animal Reproduction, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Avenida W/5 Norte Final, PqEB, CP 02372, Brasília, DF, Brazil; ²Department of Molecular Biology, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Freezing and stocking ready to use IVP medium including hormones and fetal serum is a practical alternative to rationalize work and reduce costs in in vitro embryo production. In our laboratory routine, embryo culture in frozen or fresh medium (week produced) has shown equal Day 7 blastocyst rates. Although morphological aspects were also similar, it is known that culture environment may alter gene expression patterns and embryo development on later stages. Thus, a preliminary study of mRNA expression of Igf2 in Day 14 embryos produced in both culture conditions (frozen and fresh medium) was performed. For that, IVM (TCM 199 with hormones, antibiotics, L-glutamine and 10% fetal bovine serum) and IVC medium (SOFaaci) were split in 2 ml aliquots, put into *eppendorfs* and frozen in -80°C temperature. The thawing was performed at $4-5^{\circ}\text{C}$ refrigerator overnight and the medium was stabilized in the incubator at least 4 hours prior to use. Abattoir-derived oocytes were collected and randomly distributed into the 2 culture groups: T1 (fresh IVM, fresh SOFaaci) and T2 (frozen IVM, frozen SOFaaci). On Day 7,

blastocysts classified as qualities 1 and 2 (n=12) were selected and continued in vitro culture in the PHD system (Brandão et al., 2004) under 38.5°C, 5% O₂, 5% CO₂ in air. On Day 14, elongated embryos from T1 and T2 were removed from culture and analyzed by RT-PCR (Figure 1). Total RNA was prepared from two D14 embryos (one embryo/replicate) using TRIzol Reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's protocol with modifications. The reverse transcription (RT) was done using the EZ-First Strand cDNA Synthesis Kit (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel). β -actin gene was used as a constitutive control and PCR reactions for the two genes were done in triplicates using a PTC-100 MJ Research thermocycler. PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel. The two genes were detected in both samples; the relative expression of Igf2 was higher in embryos cultivated in fresh medium (control). The present results are initial but highlight the importance of investigating the effects of in vitro culture conditions on embryonic gene expression beyond Day 7. For that purpose, the PHD system has proven to be an efficient alternative to extend embryo culture until further stages of development. In conclusion, although frozen ready to use medium is a practical strategy, further studies on molecular trends are necessary to confirm its perspective use, especially on gene expression patterns.

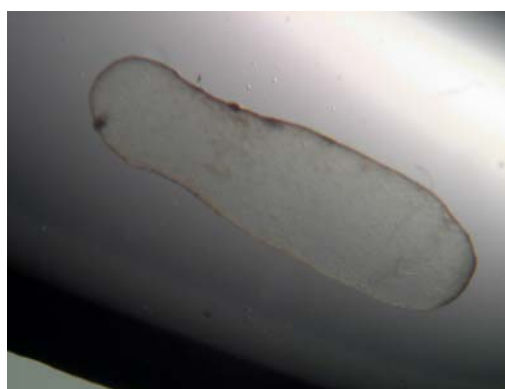


Figure 1- Day 14 embryo produced in frozen media and removed from de PHD System, ready to be processed.

CAPÍTULO 4

Discussão geral e Considerações finais

Discussão geral e Considerações finais

Há alguns anos, a produção *in vitro* de embriões bovinos tornou-se uma ferramenta importante de multiplicação do material genético de alto valor, contribuindo para a expansão da tecnologia. Entretanto, alguns problemas como os elevados índices de absorções embrionárias, bem como a complexidade da rotina de produção, contribuem para uma menor evolução dos índices atualmente obtidos, tanto de produção de embriões quanto de gestações a termo. Ao estabelecermos um sistema de cultivo pós-eclosão e a utilização de meios prontos para uso congelados na rotina, objetivamos contribuir com estes aspectos pouco explorados.

Na primeira fase do trabalho, o sistema PHD foi proposto como método de cultivo para embriões pós-eclosão até estágios mais avançados, permitindo o alongamento e diferenciação celular de mais de 50% das estruturas em cultivo (Brandão et al., 2004a). Estes dados mostram grande avanço diante dos sistemas previamente descritos pela literatura em diferentes espécies (New, 1978; Pope et al., 1982; Enders et al., 1989; Pitt e Carney, 1999; Cruz et al., 2000; Wlodarczyk et al., 2001; Balls e Hellsten, 2002) e especificamente em bovinos (Stringfellow e Thomson, 1986; Vajta et al., 2000a; Vajta et al., 2001; Alexopoulos, 2001; Alexopoulos et al., 2002; Vajta et al., 2004).

A base para construção do sistema PHD deu continuidade à mesma linha iniciada por Stringfellow e Thomson (1986), e mais tarde aperfeiçoada por Vajta e colaboradores (2000, 2001, 2004). A possibilidade de investigação do desenvolvimento inicial pós-eclosão, considerado um período “cego” para os métodos atuais, justificou o aumento gradativo do interesse neste tipo de experimentação. E desde o princípio, os parâmetros buscados para a normalidade de desenvolvimento *in vitro* foram: o rápido crescimento, alongamento e diferenciação do botão embrionário (Vajta et al., 2001; Alexopoulos et al.,

2002; Vajta et al., 2004). Mas, ainda que estes experimentos tenham contribuído muito, nenhum deles apresentou a proposta de um protocolo definido e repetível, que pudesse trazer confiabilidade e precisão. Já o sistema PHD pôde ser repetível em sistemas PIV diferentes (DIAS e Embrapa), além de pela primeira vez, possibilitar a diferenciação de todas as estruturas básicas que compõem o botão embrionário (Brandão et al., 2004a).

Alguns pontos suscitados neste trabalho trouxeram informações importantes que devem ser abordados em investigações futuras. O primeiro deles foi a importância da presença do SFB, tanto no meio PHD (10% de SFB) quanto no gel de agarose que compunha os túneis (9% de SFB). Apesar dos efeitos do SFB serem bastante variáveis dependendo de sua origem, concentração e estágio do desenvolvimento embrionário (Peura et al., 1998; Sinclair et al., 1998; Vajta et al., 2000b), sua utilização nestas concentrações permitiu resultados superiores (Brandão et al., 2004a), inclusive daqueles relatados para soro de vaca (Alexopoulos, 2001; Alexopoulos et al., 2002). Agora que o sistema PHD permite uma repetibilidade, seria válida uma nova investigação de outras fontes de proteína e fatores de crescimento, como albumina bovina sérica ou mesmo o soro de vaca, apesar de alguns deles já terem sido abordadas com menor sucesso em metodologias anteriores (Alexopoulos, 2001; Alexopoulos et al., 2002).

Outro ponto importante foi a elevadíssima concentração de glicose (27,7 mM) trabalhada no meio PHD. A importância da glicose no metabolismo energético de embriões, principalmente no período de formação da blastocle, é de conhecimento comum (Gardner, 1998; Khurana e Niemann, 2000), mas não em concentração tão elevada. Esta concentração migrou de trabalhos anteriores (Alexopoulos, 2001; Vajta et al., 2001) e mostrou-se realmente eficaz para o desenvolvimento pós-eclosão. Entretanto, ela também pode estar relacionada a um dos dados mais interessantes do trabalho, que foi a maioria absoluta de embriões machos se desenvolvendo no sistema PHD em relação

às fêmeas (97:3) quando originados de embriões Qualidade I. Neste trabalho não foi possível precisar a influência da glicose, mas Gutierrez-Adan et al. (2001) relataram que a glicose prejudicaria o desenvolvimento dos embriões fêmea. Se a glicose estaria selecionando os machos, ou se eles já haviam sido selecionados em D8 ou D9 permanece sem resposta, e abre um amplo campo de investigação do metabolismo embrionário.

Uma outra informação que chamou a atenção foi o comprometimento visível do crescimento embrionário em cultivo após D15. Apesar de sabermos ser possível o alongamento do embrião com idade bem avançada como D21 (Vajta et al., 2001), seu desenvolvimento é imediatamente comprometido em D15, sendo necessários outros experimentos para identificar o que muda deste ponto em diante. Sabe-se que neste período estão ocorrendo o reconhecimento materno da gestação (Wiltbank et al., 2002), a luteólise (Binelli et al., 2001) e modificação do ambiente uterino (Lamming et al., 1989), a elevação da produção de IFN- τ (Bartol et al., 1985; Stojkovic et al., 1999) e finalmente a invasão do endométrio pelo embrião (Hernandez-Ledezma et al., 1992). Diante destes eventos, certamente o sistema PHD deveria de este ponto em diante proporcionar uma estrutura tanto física quanto metabólica muito mais complexa, o que foi ensaiado em alguns experimentos iniciais onde foi testado o co-cultivo de células e substratos mais ricos como o colágeno e o Matrigel.

Além do estabelecimento do sistema pós-eclosão (Brandão et al., 2004a), alguns trabalhos paralelos puderam ser desenvolvidos. De forma interessante, observou-se um baixíssimo desenvolvimento dos embriões no sistema PHD durante parte do período de coleta de dados. Ao investigarmos este fato mais profundamente, foi constatada na rotina de produção in vitro uma queda concomitante nas taxas de produção de blastocistos (D7) durante vários meses, sendo então descoberto que os embriões estavam sendo

cultivados sob um de óleo mineral que progressivamente se tornara tóxico (Brandão et al., 2003). O baixo desenvolvimento dos embriões no sistema PHD, involuntariamente nos permitiu testar o potencial de produção do sistema in vitro como um todo. Neste período, os embriões obtidos apresentavam aspecto normal ao esteromicroscópio em D7, mas não conseguiram em sua maioria realizar o alongamento pós-eclosão. Associado a isso, os poucos exemplares que atingiram o alongamento apresentavam inúmeras áreas escuras no trofoblasto, possivelmente áreas de necrose, e também perdiam a região botão embrionário, ou esta se tornava muito indefinida.

Inesperadamente, este acontecimento permitiu a avaliação do potencial de desenvolvimento dos embriões D7 julgados como viáveis, mas que somente no desenvolvimento tardio demonstravam suas limitações. Ao fazermos um paralelo com as situações de rotina, estes mesmos embriões seriam transferidos para receptoras aptas, mas certamente apresentariam limitações no estabelecimento da gestação. Este evento deixou claro um dos principais potenciais do uso do sistema PHD, reforçando seu uso no monitoramento de alguns problemas comuns ocorrentes na rotina da PIV. Este tipo de abordagem associando toxicologia e desenvolvimento embrionário tem sido utilizado há muitos anos com outros modelos experimentais (New, 1978; Pope et al., 1982; Pitt e Carney, 1999; Cruz et al., 2000; Wlodarczyk et al., 2001), mas nenhum deles demonstrava este procedimento para bovinos, ou mesmo permitia uma investigação tão completa.

Na segunda parte da tese, foi sugerida uma alternativa viável para a rotina de PIV com a utilização de meios congelados prontos para uso. Até os dias de hoje, a rotina de utilização de meios segue um padrão de renovação semanal ou quinzenal dos meio finais ou prontos para uso, bem renovação mensal de seus constituintes e soluções estoque. Devido a variações de partidas de produtos, conservação e mesmo à confecção das

soluções como um todo, este procedimento permite que ocorram diferenças entre as rotinas de produção, levando a uma maior variação tanto de resultados em laboratório como na aplicação a campo. Além disto, com este procedimento o custo de produção de uma forma geral é bastante aumentado, tanto pelo desperdício dos meios, quanto pelas horas de trabalho aplicadas a esta função. Apesar de todos estes fatores, o congelamento de meios prontos não foi uma atividade estimulada nos últimos anos.

Uma das razões que explicam a não utilização do congelamento seria a produção de alterações no meio. Realmente os meios de PIV são complexos, e dentre seus produtos existem substâncias muito lábeis como componentes do soro, proteínas e hormônios. Além disso, o congelamento dos meios finais exige o re-congelamento de vários componentes, sendo esta é uma prática pouco recomendável. Entretanto, foi justamente a observação de que vários destes produtos lábeis já são rotineiramente descongelados e re-congelados em forma de alíquotas, que chamou a atenção para este experimento. Tanto o SFB quanto os hormônios, além de outras substâncias, são descongelados e re-congelados em forma de alíquotas individuais. Depois, estes produtos são novamente descongelados para preparação dos meios finais, e este procedimento não parece alterar significativamente a atividade biológica de seus componentes.

Durante a investigação da proposta de meios congelados, foi constatado que empresas tradicionais da PIV, como a Holland Genetics e a Minitub, continham dados informais de tentativas de realização do mesmo procedimento. Estas experiências relatavam a inviabilidade do congelamento devido ao surgimento de precipitações nas soluções finais após seu descongelamento. Tendo estas informações, diversos pré-experimentos demonstraram que o congelamento rápido dos meios em refrigerador a temperatura de -80°C , associado ao descongelamento lento em refrigerador a 4°C , evitavam as precipitações. Este achado poderia ser facilmente associado com as teorias

físico-químicas que envolvem os processos de congelamento de tecidos e células amplamente conhecidos (Mazur, 1970; Fahy, 1983; Fahy et al., 1987; Palasz e Mapletoft, 1996; Arav et al., 1996; Brandão, 2001). Nestes estudos, fica claro que a prevenção da formação de cristais é o grande objetivo da criopreservação, o que pode ser conseguido quando são equilibrados volume, viscosidade e velocidade de redução de temperatura (Arav et al., 1996). Ou seja, o protocolo proposto de congelamento dos meios prontos provavelmente associou com sucesso estes diferentes fatores.

Apesar da confiabilidade dos dados obtidos no laboratório DIAS, os resultados positivos de taxa de blastocisto com meios congelados poderia ser associado a algum fator inerente àquele sistema, ou mesmo às pequenas particularidades dos meios utilizados naquele laboratório. Para evitar qualquer dúvida da eficácia do congelamento de meios, o mesmo experimento foi realizado na Embrapa- Recursos Genéticos e Biotecnologia, em condições completamente diferentes, tanto de trabalho quanto de material biológico. Apesar da taxa média de produção de embriões ter sido diferente entre o sistema DIAS (39,0%) e a Embrapa (48,0%), a PIV com meio fresco ou congelado dentro de cada sistema não diferiu (Brandão et al., 2004b).

Finalmente, um último pré-experimento uniu de forma interessante os dois trabalhos principais que compõem esta tese. Os embriões produzidos in vitro a partir de meio congelado foram cultivados em sistema PHD para avaliação da expressão do mRNA de IGF2. O que observamos foi uma inversão no padrão de expressão do mRNA quando comparamos embriões D14 originados de meio a fresco ou meio congelado. Ainda que muito iniciais estes resultados são estimulantes, pois mostram o uso prático do sistema PHD como método de investigação, e chama a atenção para os efeitos do meio congelado. Se esta inversão é positiva ou não para o estabelecimento da gestação permanece em aberto, indicando que tanto podemos ter anulado fatores prejudiciais como

alterado substâncias fundamentais, e certamente deve ser foco de atenção de novos estudos usando o meio congelado.

Em suma, a tese atingiu seu objetivo ao estabelecer o sistema PHD, inclusive fazendo sua utilização em situações inseridas no contexto prático, bem como conseguiu criar uma nova proposta para a rotina da PIV com o uso dos meios congelados prontos para uso. Ambos abrem novos caminhos para o estudo de processos biológicos embrionários ainda pouco conhecidos e investigados, e corroboram para a proposta principal da execução desta tese, que foi contribuir com o avanço dos sistemas de produção in vitro de embriões bovinos da atualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAV, A., ZERON, Y., LESLIE, S. B. et al. Phase transition temperature and chilling sensivity of bovine oocytes. *Cryobiology*, v.33, p.589-599, 1996.
- ALEXOPOULUS, N.I. In vitro culture and characterization of post-hatching bovine embryos. Victoria, Australia: Monash University; 2001. Tese.
- ALEXOPOULUS, N.I., MADDOX-HYTTEL, P., VAJTA, G. Effect of protein supplementation on establishment of a hypoblast layer in IVP bovine embryos. *Theriogenology*, v. 57, p.513, 2002.
- BALLS, M., HELLSTEN, E. Statement on the scientific validity of the postimplantation rat whole-embryo culture assay - an in vitro test for embryotoxicity. *Altern.Lab.Anim.*, v.30, p.271-273, 2002.
- BINELLI, M., THATCHER, W.W., MATTOS, R. et al. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1451-1463, 2001.
- BRANDÃO, D.O. Vitriificação de ovócitos bovinos em diferentes momentos da maturação in vitro. Belo Horizonte, Brasil: Universidade Federal de Minas Gerais; 2001. Dissertação.
- BRANDÃO, D.O., PEDERSEN, A., VAJTA, G. et al. Paraffin oil in in vitro embryo production: one routine component, a sudden toxic agent. In: 19th Congress of the Association Europeenne de Transfert Embryonnaire (AETE), Rostock, Alemanha, 2003. Abstract

- BRANDÃO, D.O., MADDOX-HYTTEL, P., LOVENDAHL, P., RUMPF, R., STRINGFELLOW, D., CALLESEN, H. Post hatching development: a novel system for extended in vitro culture of bovine embryos. *Biol.Reprod.*, v.71, p.2048-2055, 2004a.
- BRANDÃO, D.O., PEREIRA, D.C., DODE, M.A.N. et al. Congelamento e estoque de meios prontos para uso: a rotina simplificada da PIV de embriões bovinos. In: XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Barra Bonita, 2004b. p.124. Abstract.
- CRUZ, Y.P., HICKFORD, D., SELWOOD, L. A staging scheme for assessing development in vitro of organogenesis stage embryos of the stripe-faced dunnart, *Sminthopsis macroura* (Marsupiala:Dasyuridae). *J.Reprod.Fertil.*, v.120, p.99-108, 2000.
- ENDERS, A.C., BOATMAN, D., MORGAN, P. et al. Differentiation of blastocysts derived from in vitro fertilized Rhesus monkey ova. *Biol.Reprod.*, v.41, p.715-727, 1989.
- FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralizers reduce freezing damage. *Cryo-letters*, v.4, p.309-314, 1983.
- FAHY, G.M., LEVY, D.I., ALI, S.E. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions and utility of vitrification solution. *Cryobiology*, v.24, p.196-213, 1987.
- FRANCO, M.M., BRANDÃO, D.O., PEREIRA, D.C. et al. Effect of frozen media on Igf2 expression of bovine embryos cultured entirely in vitro until Day 14. *Reprod.Fertil.Dev.*, v.16, p. , 2005. Abstract.
- GARDNER, D.K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, v.49, p.83-102, 1998.
- HERNANDEZ-LEDEZMA, J.J, SIKES, J.D., MURPHY, C.N. et al. Expression of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by in vitro techniques. *Biol. Reprod.*, v.47, p.374-380, 1992.
- KHURANA, N.K., NIEMAN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.*, v.62, p.847-856, 2000.
- LAMMING, G.E., DARWASH, A.O., BACK, H.L. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. *J.Reprod.Fertil.*, v.37, p.245-252, 1989.
- MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, v.168, p.939-949, 1970.
- NEW, D.A.T. Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, v.53, p.81-122, 1978.

- PALASZ, A. T., MAPLETOFT, R. J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, v. 14, n.2, p.127-149, 1996.
- PEURA, T.T., LEWIS, I.M., TROUNSON, A.O. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. *Mol Reprod Dev* 1998; 50:185-191.
- PITT, J.A., CARNEY, E.W. Evaluation of various toxicants in rabbit whole embryo culture using a new morphologically-based evaluation system. *Teratology*, v.59, p.102-109, 1999.
- POPE, L., POPE, V.Z., BECK, L.R. Development of Babbon pre-implantation embryos to post-implantation stages in vitro. *Biol. Reprod.*, v.27, p.915-923, 1982.
- SINCLAIR, K.D., MCEVOY, T.G., CAROLAN, C. et al. Conceptus growth and development following in vitro culture of ovine embryos in media supplemented with bovine sera. *Theriogenology*, v.49, p.218, 1998.
- STOJKOVIC, M., BÜTTNER, M., ZAKHARTCHENKO, V. et al. Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture: comparison of in vivo derived, in vitro produced, nuclear transfer and demi-embryos. *Anim.Reprod.Sci.*, v.55, p.151-162, 1999.
- STRINGFELLOW, D.A., THOMPSON, M.S. Maintenance and development of bovine embryos in vitro. *Alabama Agricultural Experiment Station: Highlights of Agricultural Research*, v. 33, p.11, 1986.
- VAJTA, G., HYTTEL, P., TROUNSON, A.O. Post-hatching development of in vitro produced bovine embryos on agar and collagen gels. In: 14 th International Congress on Animal Reproduction; Stockholm, v.18, p.34, 2000a.
- VAJTA, G., PEURA, T.T., HOLM, P. et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the well of the well (WOW) system. *Mol. Reprod. Dev.*, v.55, p.256-264, 2000b.
- VAJTA, G., MADDOX-HYTTEL, P., ALEXOPOULUS, N. et al. In vitro development of IVM/IVF bovine embryos cultured beyond 30 days in different protein sources. *Theriogenology*, v.55, p.344, 2001.
- VAJTA, G., ALEXOPOULUS, N., CALLESEN, H. Rapid growth and elongation of bovine blastocysts in vitro in a three-dimensional gel system. *Theriogenology*, v.7, p.1253-63, 2004.
- WILTBANK, M.C., GÜMEN, A., SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.21-52, 2002.
- WLODARCZYK, B., BIERNACKI, B., MINTA, M. et al. Postimplantation whole embryo culture assay for hamsters: an alternative to rat and mouse. *Scientific World Journal*, v.1, p.227-234, 2001.