

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

VARIABILIDADE NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES
Mus domesticus domesticus

LUCIANE PANSARDI CABREIRA BAPTISTA

Porto Alegre

2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

VARIABILIDADE NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES
Mus domesticus domesticus

AUTORA: LUCIANE PANSARDI CABREIRA BAPTISTA

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Biotécnicas da Reprodução Animal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (RS).

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues

PORTO ALEGRE, março 2004

Às pessoas de boa vontade,
persistência e dedicação.

Aprovada por:

Prof. Dr. Alceu Mezzalira

Membro da Comissão

Profa. Dra. Adriana Bos Mikich

Membro da Comissão

Dr. Ricardo Azambuja

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Essencialmente aos meus pais, irmãos, esposo e filhos, que muitas vezes privados de minha presença ou abdicando de suas vontades em função de meus compromissos acadêmicos, tornaram-me mais convicta na conquista de meu ideal.

Ao Professor Doutor José Luiz Rodrigues pela oportunidade e orientação dispensados durante a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela parcialidade na qualificação profissional.

À FEPPS (Fundação Estadual de Produção de Pesquisa da Saúde) pelos animais utilizados no experimento.

Ao Núcleo de Estatística da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo auxílio na análise dos dados.

Ao Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução e seus integrantes que constituíram o âmbito de amizades que me acolheu.

Em especial, a Fabiana Forell pelo auxílio, confiança e amizade incondicional conferidos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	Vii
LISTA DE ABREVIATURAS	Viii
1 INTRODUÇÃO	10
2 ARTIGO	15
2.1 RESUMO	15
2.2 ABSTRACT	16
2.3 INTRODUÇÃO	17
2.4 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.5 RESULTADOS	20
2.6 DISCUSSÃO	25
2.7 CONCLUSÃO.....	28
3 PERSPECTIVAS	28
4 REFERÊNCIAS	30
5 ANEXO 1.....	34
6 ANEXO 2.....	35
7 ANEXO 3.....	38
8 ANEXO 4.....	39

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Taxas de produção e de desenvolvimento embrionário *in vitro* de zigotos *Mus domesticus domesticus* obtidos de fêmeas agrupadas de acordo com o número de estruturas coletadas..... 20
- TABELA 2 – Média e desvio padrão da produção e do desenvolvimento embrionário *in vitro* de zigotos *Mus domesticus domesticus* obtidos de fêmeas agrupadas de acordo com o número de estruturas coletadas.....21
- TABELA 3 – Produção e desenvolvimento embrionário *in vitro* de zigotos *Mus domesticus domesticus* obtidos do acasalamento com diferentes machos.....22
- TABELA 4 – Média e desvio padrão da produção e do desenvolvimento embrionário *in vitro* de zigotos *Mus domesticus domesticus* obtidos do acasalamento de diferentes machos.....23
- TABELA 5 – Taxa de acasalamento e produção de zigotos *Mus domesticus domesticus* de camundongas novas e reutilizadas.....24
- TABELA 6 – Taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* de zigotos *Mus domesticus domesticus* obtidos de fêmeas novas e reutilizadas.....24

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (acquired immunodeficiency syndrome)
ANOVA	Análise de Variância
BSA	Albumina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin)
°C	Grau Celsius
CF1	Linhagem de Camundongos
CO ₂	Dióxido de Carbono
CZB	Meio de Cultivo Suplementado com Glicose
ddy	Linhagem de Camundongos
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina (Equine Chorionic Gonadotropin)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético (Ethylenediamine-Tetraacetic Acid)
FSH	Hormônio Folículo Estimulante (Follicle Stimulating Hormone)
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina (Gonadotropin-Releasing Hormone)
h	Hora (s)
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana (Human Chorionic Gonadotropin)
KSOM	Meio de Cultivo Simplificado Acrescido de K ⁺
LH	Hormônio Luteinizante (Luteinizing Hormone)
μL	Microlitro (s)
M16	Meio de Cultivo de Embriões
mg	Miligrama (s)
mL	Mililitro (s)
mOsm	Miliosmol (s)
mRNA (s)	Ácido Ribonucléico Mensageiro
OF1	Linhagem de Camundongos

PBSm	Solução Salina Fosfatada Tamponada Modificada
pH	Potencial Hidrogeniônico
SFB	Soro Fetal Bovino
UI	Unidade Internacional
vs	Versus

1. INTRODUÇÃO

Peters *et al.* (1975) consideram o crescimento folicular, como um evento básico da fisiologia ovariana, sendo contínuo e ininterrupto durante as diferentes fases do ciclo estral. Bavister (1995) destaca que o desenvolvimento embrionário, tem início com a produção de um oócito normal. Lehthonen e Kankondi (1987); Ertzeid e Storeng (1992); Mailhes *et al.* (1998) e Ozgunen *et al.* (2001) relatam em seus experimentos, uma média de 7 a 10 oócitos recuperados da ovulação espontânea de *Mus domesticus domesticus*, independente da linhagem, destacando que um estímulo hormonal exógeno proporciona aumento no rendimento embrionário. Licht *et al.* (1979) relatam que a eficiência do estímulo exógeno sobre a resposta ovariana, pode variar conforme a idade, peso, linhagem, estado nutricional e de saúde, dose de gonadotrofina administrada e também conforme às características individuais das fêmeas.

Nos experimentos de Lehthonen e Kankondi (1987); Muñoz *et al.* (1994); Wang *et al.* (2001); Ozgunen *et al.* (2001) e Tarín *et al.* (2002), utilizam-se tratamentos superovulatórios, para aumentar a capacidade de produzir oócitos em resposta a um estímulo hormonal exógeno do ovário. Os mesmos autores, relatam uma média superior a 20 estruturas recuperadas por doadora, independente da linhagem das camundongas, origem, dose e local de aplicação da gonadotrofina.

Segundo Muñoz *et al.* (1994), a recuperação dos oócitos 20 h após a injeção intraperitoneal de hCG, no tratamento superovulatório, corresponde a um período de 7 a 8 h pós-ovulatório. De acordo com Mailhes *et al.* (1998) os oócitos podem ser fecundados dentro de um período de 7 a 8 h antes do processo natural de degeneração, que já pode ser observado 15 h após a ovulação *in vivo*.

Lehthonen e Kankondi (1987), relatam em seus experimentos que o uso de gonadotrofinas aumenta a incidência de oócitos anormais. Achados de Tarín *et al.* (2002),

sugerem que a administração de gonadotrofina sincronizada com o estágio do ciclo estral em camundongas, otimiza a qualidade dos oócitos coletados dos ovidutos.

Wang *et al.* (2001) utilizam em seus experimentos, para a indução da superovulação a imuno-neutralização da inibina endógena. Este hormônio produzido pelos folículos em desenvolvimento, exerce atividade na regulação da secreção do FSH. De acordo com experimento conduzido por Taia e Watanabe (1999) existe uma relação negativa entre as concentrações plasmáticas do FSH e da inibina. Wang *et al.* (2001) consideram que diferenças na produção de oócitos e embriões em resposta ao tratamento superovulatório, em diferentes dias do ciclo estral, também observadas por Tarín *et al.* (2002), deveriam ser atribuídas a diferentes populações foliculares no ovário em diferentes estádios do ciclo ou a diferença na concentração de outros fatores regulatórios negativos de secreção gonadotrófica, tais como estradiol.

Em roedores, ratos e camundongos, os achados descritos por Miller e Armstrong (1981b); Ertzeid e Storeng (1992) e Tarín *et al.* (2002) sugerem que os tratamentos superovulatórios alteram as concentrações hormonais ovarianas, resultando em função anormal do trato reprodutivo. Os resultados de Walton e Armstrong (1981); Lehtonen e Kankondi (1987); Ertzeid e Storeng (1992) e Wang *et al.* (2001), confirmam que a superovulação, bem como a indução da ovulação, afetam negativamente o desenvolvimento embrionário e fetal. Desta forma, os fatores que podem retardar ou interromper a gestação normal em ratas (Miller e Armstrong 1981b) e camundongas (Ertzeid e Storeng 1992) superovuladas são complexos e alteram-se com o aumento da dose de gonadotrofinas (Miller e Armstrong 1981b; Ozgunen *et al.*, 2001 e Wang *et al.*, 2001). Muñoz *et al.* (1994) destacam que o cultivo *in vitro* é influenciado pela origem da gonadotrofina, e ainda dependendo do meio de cultivo utilizado.

Durante a foliculogênese, o FSH estimula a multiplicação das células da granulosa e a síntese de estradiol produzida pelos folículos em maturação (Ozgunen *et al.*, 2001). De acordo com Walton e Armstrong (1981) é no entanto provável, que a longa meia-vida do eCG estimule a produção de estrogênio em quantidade e por um período maior de tempo, determinado pelos níveis deste hormônio no ovário e no sangue de ratas impúberes. Nos experimentos de Wang *et al.* (2001) em consequência de tratamentos superovulatórios,

diferentes doses de eCG utilizadas levam ao aumento do número de oócitos e embriões anormais.

Fujimoto *et al.* (1974) ressaltam que o tratamento com gonadotrofinas exógenas provocaria defeitos genéticos nos oócitos. De acordo com Walton *et al.* (1983) em ratas o aumento da incidência de oócitos anormais é devido ao envelhecimento gradual do gameta, caracterizado pela degeneração e fragmentação, uma vez que, eles foram ovulados como consequência do tratamento superovulatório. De acordo com Lehtonen e Kankondi (1987) este fato também pode ser explicado pela ocorrência das alterações degenerativas pós-fecundação.

Em ovinos tratados com eCG na fase final da foliculogênese, iniciada pela onda de LH, os compartimentos somático e germinal do oócito se alteram. A ativação prematura do compartimento germinal resulta em oócitos envelhecidos ou anormais e um trato reprodutivo inadequado (Moor *et al.*, 1985).

Ozgunen *et al.* (2001) acreditam que o pareamento ou o acasalamento também influenciam a ovulação e a maturidade dos oócitos, através dos seguintes mecanismos: 1) exposição aos ferormônios masculinos pode induzir o pulso gerador de liberação de GnRH feminino, agindo centralmente através de neurotransmissores no eixo hipotálamo-hipófise-gônada; 2) o próprio coito pode atuar centralmente, por uma via neuro-endócrina para influenciar o hipotálamo, e 3) algumas substâncias humorais nas glândulas acessórias dos machos, transferidas para a fêmea durante a cópula, podem exercer efeito local, atuando como moléculas sinalizadoras necessárias para a liberação do oócito.

Raz e Shalgi (1998) destacam que a ativação oocitária é iniciada na fecundação através de uma série de eventos morfológicos e bioquímicos que possibilitam a retomada do ciclo celular e início das divisões mitóticas. Estes eventos permitem o entendimento de informações a respeito de mudanças que incluem, segundo Bavister (2000): a reorganização do citoplasma e organelas; a combinação dos genomas paterno e materno; a alteração dos caminhos geradores de energia; e a ativação de mecanismos homeostáticos intracelulares (Babinet *et al.*, 1990).

Após a fecundação, os primeiros eventos do desenvolvimento embrionário são controlados pelos genes maternos, produtos acumulados no oócito durante a oogênese (Latham *et al.*, 1991; Latham e Solter, 1991 e Renard *et al.*, 1994). Desta forma, no final da

foliculogênese o oócito deve conter todas as proteínas e/ou transcritos que codificam as enzimas requeridas pelas vias metabólicas necessárias ao desenvolvimento do zigoto (Eppig *et al.*, 1998; Ménézo *et al.*, 1998).

Os estudos de controle genético da embriogênese, incluindo os de transição do controle materno para o embrionário, são pormenorizadamente referidos por Flach *et al.* (1982); Renard *et al.* (1994); Bouniol *et al.* (1995); Aoki *et al.* (1997) e Souza *et al.* (1998). Utilizando-se de diferentes métodos experimentais, estes autores revelam os mecanismos de regulação da atividade transcricional, o estágio de desenvolvimento ou ciclo celular em que ocorrem, a análise quantitativa da síntese de proteínas (Latham *et al.*, 1991) e sugerem que a base molecular para esta reprogramação pode usar fatores de transcrição maternos derivados ou sintetizados de RNAm recrutados durante a maturação do oócito. Conseqüentemente, servem de suporte para examinar a influência de fatores epigenéticos no desenvolvimento. Segundo Bavister (1995), até certo ponto, a regulação epigenética e genética do desenvolvimento são inseparáveis, porque cada uma afeta a outra, no entanto, na prática estes tópicos representam diferentes delineamentos experimentais.

Poueymirou *et al.* (1989) ressaltam que, em geral, a habilidade do meio de cultivo em suportar o desenvolvimento embrionário para além do estágio de 2 células, está correlacionada com a taxa e o padrão de síntese de proteínas, que reflete a ativação da transcrição do genoma embrionário (Latham *et al.*, 1991) e a expressão dos genes impressos no desenvolvimento embrionário subsequente. As observações do cultivo de células tronco por Khosla *et al.* (2001) suportam as hipóteses de que o cultivo na presença de soro pode influenciar a regulação de múltiplos genes impressos relacionados ao desenvolvimento, bem como as taxas de desenvolvimento, medidas de diâmetro e número de células, observados no trabalho de Eppig e O'Brien (1998), a partir de oócitos oriundos de folículos pré-antrais desenvolvidos *in vitro* com utilização de soro fetal bovino (SFB).

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

os sistemas de cultivo embrionário *in vitro*, proporcionam uma transformação de agentes biológicos como, por exemplo, as enzimas, interferindo nos resultados (Ménézo *et al.*, 1998).

Os dados de Kamjoo *et al.* (2002) sugerem que a bagagem genética dos embriões e a composição química do meio são igualmente importantes na determinação do nível de apoptose, que contraditoriamente possui potencial de eliminação não somente de células indesejáveis, mas também de células viáveis, o que pode causar a morte do organismo.

Apesar das diferentes pesquisas realizadas no âmbito da produção de oócitos ou embriões, utilizando diferentes tratamentos superovulatórios, avaliando de diferentes formas experimentais, a etapa de fecundação e o cultivo, os mecanismos responsáveis pelo retardo no desenvolvimento embrionário *in vitro* ainda não puderam ser esclarecidos. Por outro lado, muitas hipóteses puderam ser propostas para explicar a diversidade das anormalidades observadas. O objetivo do experimento foi determinar em doadoras superovuladas *Mus domesticus domesticus*, a variabilidade no número de embriões produzidos, com capacidade de desenvolver-se *in vitro* até o estágio de blastocisto eclodido. Ao mesmo tempo foi verificado o potencial das fêmeas submetidas a duas superovulações subseqüentes em produzir embriões viáveis. A influência dos machos utilizados no experimento também foi levada em consideração.

2. ARTIGO

Variabilidade na produção de embriões *Mus domesticus domesticus*

RESUMO

O experimento foi conduzido para verificar a variabilidade na produção de embriões *Mus domesticus domesticus* linhagem CF1, nas condições do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da UFRGS, determinando as taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto e blastocisto eclodido. As 4196 estruturas embrionárias foram obtidas de 74 fêmeas adultas, acasaladas na proporção de uma fêmea para cada um dos 5 machos utilizados no experimento. Os zigotos de cada fêmea doadora, foram cultivados *in vitro* em meio KSOM, em atmosfera gasosa úmida de 5 % de CO₂ à temperatura de 37°C durante 120 horas. Os dados obtidos foram analisados por meio de correlação e testes de homogeneidade de variância (ANOVA) e Tukey com transformação em raiz quadrada, para as 74 fêmeas distribuídas em grupos e para os cinco machos diferentes. As fêmeas foram distribuídas em cinco grupos (G1 a G5) conforme o número de estruturas coletadas. As taxas de clivagem foram as seguintes: 63% (36/57) G1; 86% (242/280) G2; 83% (606/726) G3; 85% (587/691) G4 e 83%(808/973) G5. As taxas de desenvolvimento até blastocisto 61% (22/36) G1; 51% (124/242) G2; 62% (273/606) G3; 63% (370/587) G4 e 58% (468/808) G5. As taxas de eclosão dos blastocistos 36% (13/36) G1; 31% (76/242) G2; 42% (253/606) G3; 45% (262/587) G4 e 36% (293/808) G5. O teste de homogeneidade de variância mostrou diferença significativa entre as 74 fêmeas com $p=0,031$ para taxa de clivagem, $p= 0,012$ para taxa de blastocisto e $p=0,003$ para a taxa de eclosão. Os machos também influenciaram nos resultados ($p<0,05$) destacando-se o de número (5) como o de maior potencial na produção de embriões viáveis. Os dados também foram analisados pelo teste Qui-quadrado, para verificar o potencial das fêmeas, submetidas a duas superovulações subseqüentes, em produzir embriões viáveis. Tratamentos superovulatórios subseqüentes modificam a capacidade das fêmeas em produzir embriões viáveis ao desenvolvimento *in vitro*. Os resultados evidenciaram uma variabilidade no número de embriões competentes ao desenvolvimento na espécie *Mus domesticus domesticus*, considerando-se a fêmea doadora, o macho empregado e a reutilização das fêmeas que fracassaram no primeiro acasalamento.

Palavras chave: variabilidade, zigotos, cultivo, clivagem e pré- implantação.

ABSTRACT

The experiment was conducted to verify the variability in the *Mus domesticus domesticus* (CF1 strain) embryo production, under the conditions of the Laboratory of Embryology and Biotechnics of Reproduction of the Veterinary Faculty, UFRGS. The embryonic cleavage and development rates to the blastocyst and hatched blastocysts stages were determined. The females were mated individually with five (5) different males and from 74 donors 4196 structures were collected. All zygotes of each female donor, were *in vitro* cultured in KSOM medium, incubated at 37°C in a 5%CO₂ air humidified atmosphere during 120 h. The data were analyzed by correlation, ANOVA and Tukey tests with square transformation for the 74 females assembled in groups and for the five different males. The females were distributed in five groups (G1- G5) according to the number of collected structures. The cleavage rates were the following ones: 63% (36/57) G1; 86% (242/280) G2; 83% (606/726) G3; 85% (587/691) G4 e 83%(808/973) G5. The development rates until the blastocysts stage 61% (22/36) G1; 51% (124/242) G2; 62% (273/606) G3; 63% (370/587) G4 e 58% (468/808) G5. The hatched blastocysts rates 36% (13/36) G1; 31% (76/242) G2; 42% (253/606) G3; 45% (262/587) G4 e 36% (293/808) G5. The Variance Homogeneity Test showed significant difference among the 74 females with p=0,031 for cleavage rates, p= 0,012 for blastocysts rates and p=0,003 for hatched blastocysts rates. The males also influenced the results (p <0,05) and the number five (5) stood out from the others for its major potential in the production of viable embryos. The data were also analyzed by the CHI-Square Test, to verify the potential of the females submitted to two consecutive superovulations in producing viable embryos. Regarding the response to the first superovulatory treatment, the females were more efficient (p <0,05) in the production and embryonic development. The results revealed the variability in the number of produced embryos and in its development competence to reach the hatched blastocyst stage taking into account the female donor and the male.

Keywords: variability, zygotes, culture, cleavage and preimplantation.

2.3. INTRODUÇÃO

Atividades laboratoriais são realizadas como rotina com a espécie *Mus domesticus domesticus*, sobretudo nas fases iniciais de desenvolvimento embrionário. Os camundongos têm um ciclo de vida curto em relação a outros mamíferos, as fêmeas possuem ciclo estral de 4 dias e o período gestacional entre 19 e 21 dias, o que os torna um modelo experimental apropriado na área de embriologia.

Na embriologia experimental, os protocolos de superovulação procuram otimizar o número de zigotos e/ou embriões coletados e, conforme Ozgunen *et al.* (2001), reduzem o número de animais necessários à realização dos experimentos, sem reduzir a exatidão dos resultados. No entanto, já foi verificado em outras espécies, como por exemplo em ovinos (Moor *et al.*, 1985) que os tratamentos superovulatórios promovem mudanças nos compartimentos somáticos e germinais, responsáveis pela maturação dos oócitos no final da foliculogênese. A ativação precoce do compartimento germinal resulta em anormalidades, que assemelham-se aos do processo natural de degeneração.

O oócito contém todas as proteínas e/ou transcritos necessárias ao desenvolvimento do zigoto (Eppig *et al.*, 1998; Ménézo *et al.*, 1998) pois, após a fecundação, os produtos acumulados no oócito controlam os primeiros eventos do desenvolvimento embrionário (Latham *et al.*, 1991; Latham e Solter, 1991 e Renard *et al.*, 1994).

De acordo com Poueymirou *et al.* (1989), no camundongo a incapacidade do desenvolvimento embrionário *in vitro* além do estágio de 2-células pode ser devida à composição do meio de cultivo, sendo este um dos fatores essenciais na eficiência do sistema de cultivo em proporcionar o desenvolvimento embrionário. Por outro lado verifica-se, que delineamentos experimentais com esta espécie, são comumente alvo de críticas (Bavister, 1995), apesar dos experimentos serem realizados com linhagens com padrão genético conhecido e de adotar-se parâmetros capazes de identificar e descartar os embriões que possuem o potencial de desenvolvimento comprometido.

Chatot *et al.* (1990a); Gardner e Lane, (1996) em seus delineamentos experimentais tiveram o cuidado de distribuir os embriões coletados de cada doadora em diferentes tratamentos, respeitando a possível variabilidade do potencial individual das fêmeas na produção de embriões capazes de alcançar o estágio de blastocisto eclodido.

Com o intuito de promover o aperfeiçoamento dos delineamentos experimentais com embriões *Mus domesticus domesticus*, os objetivos do trabalho foram, determinar a variabilidade no número de embriões produzidos por doadoras superovuladas, com capacidade de desenvolver-se *in vitro* até o estágio de blastocisto eclodido, identificar a influência dos machos utilizados no experimento sobre o número de embriões produzidos pelas fêmeas doadoras, e verificar o potencial das fêmeas submetidas a duas superovulações subseqüentes em produzir embriões viáveis ao desenvolvimento *in vitro*.

2.4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 74 fêmeas adultas (a partir de 6 semanas de idade) da espécie *Mus domesticus domesticus*, da linhagem CF1 suíça Albina. Durante o experimento foram utilizados 5 machos da mesma linhagem com capacidade reprodutiva comprovada. Todos os animais foram alojados em um ambiente com temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), iluminação diária de 14 horas (das 08:00 às 22:00h) e alimentação *ad libitum*, com ração peletizada e água.

As fêmeas foram induzidas à superovulação mediante aplicação via intraperitoneal de 10 UI (0,1 mL) de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG; NOVORMON[®] SYNTEX) e 46 h mais tarde de 10 UI (0,1 mL) de gonadotrofina coriônica humana (hCG. PROFASI HP[®] ORGANON) quando foram acasaladas com um dos cinco machos. Na manhã do dia seguinte ao acasalamento (dia 1 da prenhez) as fêmeas foram examinadas quanto a presença do tampão vaginal. As que apresentavam o tampão vaginal foram identificadas e alojadas em grupos para a coleta dos embriões (fêmeas placa positiva). As fêmeas que não apresentaram tampão vaginal (fêmeas placa negativa) foram agrupadas em outras gaiolas e utilizadas em nova superovulação (fêmeas reutilizadas) após um intervalo mínimo de 14 dias.

No dia 1 de prenhez (22:00h após a injeção de hCG), as doadoras de embriões foram sacrificadas por deslocamento cervical, com subseqüente abertura da cavidade abdominal. Os cornos uterinos junto com os ovidutos foram retirados através de duas incisões, uma na bursa ovárica separando a salpinge do ovário e a outra na base do corno uterino. As estruturas de cada uma das fêmeas foram recuperadas sob lupa

estereomicroscópica, com luz incidente e magnitude de 10X, através da incisão da dilatação da salpinge, quando se fez presente, ou por perfusão através do lúmen do oviduto de aproximadamente 0,2 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBSm; Whittingham, 1971) suplementada com 20 % de SFB. Após os zigotos de cada fêmea coletada que encontravam-se envoltos pelo complexo *Cumulus oophorus*, foram expostos, durante 30 segundos, a gotas de PBSm contendo 80 UI/mL de hialuranidase, para a dissociação das células.

Posteriormente, as estruturas recolhidas de cada doadora, foram lavadas por sucessivas passagens em 10 gotas de 100µl de PBSm, sendo após contadas e selecionadas. Na seleção morfológica, foram considerados zigotos com bom potencial de desenvolvimento aqueles com ausência de fragmentação, contorno regular e simétrico, zona pelúcida intacta, citoplasma com cor e aspecto citoplasmático homogêneo característico para a espécie, presença de corpúsculo polar e, quando possível, visualização de pró-núcleos, de acordo com Poueymirou *et al.*, 1989.

Os zigotos selecionados de cada fêmea doadora foram cultivados sob óleo mineral em gotas de 100 µL de meio KSOM (Erbach *et al.*, 1994) suplementado com 0,4% de BSA, em atmosfera gasosa úmida de 5% de CO₂ à temperatura de 37°C durante 120 h.

Para a avaliação da variabilidade na taxa de desenvolvimento embrionário entre as fêmeas *Mus domesticus domesticus*, foram determinadas as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto e de blastocisto eclodido para cada doadora de embriões.

Os dados de desenvolvimento embrionário (estruturas cultivadas, taxa de clivagem, produção de blastocistos e eclosão *in vitro*) foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA), com medidas repetidas. Quando observada diferença significativa foi realizada a análise complementar utilizando o teste de Tukey com transformação quadrática.

Para a comparação dos dados de produção embrionária entre os grupos de doadoras superovuladas uma vez (fêmeas novas) ou com tratamento superovulatório repetido (placas negativas reutilizadas) foi utilizado o teste do Qui-quadrado.

2.5. RESULTADOS

As 74 fêmeas doadoras coletadas proporcionaram a recuperação de 4196 estruturas. Destas, 2727 (65%) foram selecionadas como zigotos e submetidas ao cultivo em meio KSOM por 120 h. No cultivo 2279 (83%) clivaram, 1357 (60%) embriões atingiram o estágio de blastocisto e 897 (39%) blastocistos eclodiram (Tabelas 1, 3, 5 e 6).

Para efeitos estatísticos os resultados da produção, cultivo e desenvolvimento *in vitro* de zigotos CF1 obtidos das 74 fêmeas doadoras foram organizados em grupos (G1 a G5), conforme o número de estruturas recuperadas de cada fêmea: Grupo 1 (G1), reuniu 6 fêmeas contendo até 20 estruturas coletadas; G2, 16 fêmeas com 21 a 40 estruturas coletadas; G3, 23 fêmeas com 41 a 60 estruturas coletadas; G4, 15 fêmeas com 61 a 80 estruturas coletadas; e G5, 14 fêmeas contendo acima de 80 estruturas coletadas (Tabelas 1 e 2). O teste de homogeneidade de variância, com transformação quadrática dos dados, mostrou diferença significativa (Tabela 1) entre as 74 fêmeas coletadas dentro dos grupos, para o número de estruturas cultivadas ($p=0,001$), para o número de estruturas clivadas ($p=0,031$), para o número de blastocistos ($p=0,012$) e para o número de eclosões ($p=0,003$).

Tabela 1: Taxas de produção e desenvolvimento embrionário *in vitro* de zigotos *Mus domesticus domesticus* obtidos de fêmeas agrupadas de acordo com o número de estruturas coletadas.

Grupo (estruturas)	Fêmeas N	Estruturas coletadas N	Zigotos cultivados*		Clivagem**		Blastocisto***		Blastocisto eclodido***	
			N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
G1 (até 20)	6	77	57	(74)	36	(63)	22	(61)	13	(36)
G2 (21-40)	16	483	280	(58)	242	(86)	124	(51)	76	(31)
G3 (41-60)	23	1164	726	(62)	606	(83)	373	(62)	253	(42)
G4 (61-80)	15	1023	691	(68)	587	(85)	370	(63)	262	(45)
G5 (+ 80)	14	1449	973	(67)	808	(83)	468	(58)	293	(36)
♦p =			0,001		0,031		0,012		0,003	
Total	74	4196	2727	(65)	2279	(84)	1357	(60)	897	(39)

♦o valor de p, corresponde ao nível de significância para os dados dentro dos grupos, pelo teste de homogeneidade de variância

*% de zigotos cultivados sobre o número de estruturas coletadas

**% de clivagem sobre número de zigotos cultivados

***% de blastocistos e de blastocistos eclodidos sobre o número de clivados

Quando foram consideradas as médias de produção embrionária (Tabela 2), a análise estatística mostrou diferença significativa entre os grupos G1, G3, G4 e G5 para o número de embriões cultivados ($p=0,000$), sendo que G3 não diferiu de G2 e G4. A taxa de

clivagem mostrou diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos G1, G3, G4 e G5, sendo que G3 não diferiu de G2 e G4.

Não houve diferença estatística entre os grupos G1, G2 e G3 e entre os Grupos G2, G3, G4 e G5 ($P > 0,05$) entre as médias de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto e para os embriões que alcançaram o estágio de blastocisto eclodido, havendo diferença estatística somente dos grupos G4 e G5 quando comparados ao G1 (Tabela 2).

Tabela 2: Média e desvio padrão da produção, e do desenvolvimento embrionário *in vitro* de zigotos *Mus domesticus domesticus* obtidos de fêmeas agrupadas de acordo com o número de estruturas coletadas.

Grupo Estruturas	Fêmeas N	Estruturas coletadas X	Zigotos cultivados*		Clivagem**		Blastocisto***		Blastocisto eclodido***	
			X	(dp)	X	(dp)	X	(dp)	X	(dp)
G1(até 20)	6	13	10 ^a	2,2	6 ^a	3,1	4 ^a	3,2	2 ^a	3,0
G2 (21-40)	16	30	18 ^{ab}	7,2	15 ^{ab}	7,5	8 ^{ab}	6,4	5 ^{ab}	4,5
G3 (41-60)	23	51	32 ^{bc}	17,7	26 ^{bc}	17,0	16 ^{ab}	15,3	11 ^{ab}	11,3
G4 (61-80)	15	68	46 ^c	17,9	39 ^{cd}	19,8	25 ^b	15,7	17 ^b	14,6
G5 (+ 80)	14	104	70 ^d	17,4	58 ^d	25,3	33 ^b	22,3	21 ^b	41,0

a,b,c,d números seguidos de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$), pelo teste de ANOVA e Tukey com transformação quadrática

*média de zigotos cultivados sobre o número de estruturas coletadas

**média de clivagem sobre número de zigotos cultivados

***média de blastocistos e de blastocistos eclodidos sobre o número de clivados

As Tabelas 3 e 4 apresentam os resultados levando-se em consideração os machos que foram acasalados com as 74 fêmeas. Na Tabela 3, são apresentados os dados totais e percentuais destes grupos de fêmeas. O teste de homogeneidade de variância mostrou diferença estatística dentro dos grupos de fêmeas acasaladas com os diferentes machos, somente para as taxas de desenvolvimento embrionário até blastocisto eclodido ($p = 0,019$).

Tabela 3: Produção e desenvolvimento embrionário *in vitro* de zigotos *Mus domesticus domesticus* obtidos do acasalamento com diferentes machos.

Machos	Fêmeas N	Estruturas coletadas N	Zigotos cultivados*		Clivagem**		Blastocisto***		Blastocisto eclodido***	
			N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)

1	16	835	440 (53)	359 (82)	238 (66)	163 (45)
2	17	1009	704 (70)	542 (77)	292 (54)	199 (37)
3	11	545	304 (56)	262 (86)	143 (55)	90 (34)
4	20	1060	735 (69)	592 (81)	339 (57)	178 (30)
5	10	747	544 (73)	524 (96)	345 (66)	267 (51)
♦p=			0,082	0,155	0,236	0,019
Total	74	4196	2727 (65)	2279 (84)	1357 (60)	897 (39)

♦o valor de p, corresponde à diferenças para os dados dentro dos grupos de fêmeas acasaladas com os machos, pelo teste de homogeneidade de variância

*% de zigotos cultivados sobre o número de estruturas coletadas

**% de clivagem sobre número de zigotos cultivados

***% de blastocistos e de blastocistos eclodidos sobre o número de clivados

A Tabela 4 mostra que as médias de zigotos cultivados das fêmeas doadoras acasaladas com os machos 1 e 3 (28 e 28 zigotos, respectivamente), diferiram significativamente ($p < 0,05$) do macho 5 (54 zigotos). No entanto, não houve diferença das médias dos camundongos 2 e 4 (41 e 37, respectivamente) em relação ao macho 5. As mesmas diferenças entre estes machos foram observadas para as médias de estruturas clivadas e que alcançaram o estágio de desenvolvimento de blastocisto. Os machos 1, 2, 3 e 4 utilizados para a obtenção de embriões diferiram significativamente ($p < 0,05$) nas taxas de blastocisto eclodido, quando comparados com o macho 5. Houve diferença entre os grupos de fêmeas acasaladas com os machos de 1 à 5 para as taxas de cultivo ($p = 0,041$), clivagem ($p = 0,017$), blastocisto ($p = 0,040$) e blastocisto eclodido ($p = 0,003$).

Tabela 4: Média e desvio padrão da produção e do desenvolvimento embrionário *in vitro* de zigotos *Mus domesticus domesticus* obtidos do acasalamento de diferentes machos.

Machos	Fêmeas N	Estruturas coletadas X	Zigotos cultivados*		Clivagem**		Blastocisto***		Blastocisto eclodido***	
			X	(dp)	X	(dp)	X	(dp)	X	(dp)
1	16	52	28 ^a	20,0	22 ^a	18,4	15 ^a	14,1	10 ^a	9,7

2	17	59	41 ^{ab}	28,1	32 ^{ab}	26,8	17 ^{ab}	20,6	12 ^a	14,5
3	11	50	28 ^a	16,5	24 ^a	15,4	14 ^a	16,8	9 ^a	11,5
4	20	53	37 ^{ab}	22,6	30 ^{ab}	21,6	17 ^{ab}	14,2	9 ^a	8,6
5	10	75	54 ^b	26,8	52 ^b	26,0	35 ^b	18,6	27 ^b	16,0
♦p=			0,041		0,017		0,040		0,003	

^{a,b} números seguidos de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$), pelo teste de ANOVA e Tukey com transformação quadrática.

♦ o valor de p, corresponde à diferenças para os dados entre os grupos de fêmeas acasaladas com os machos, pelo teste de homogeneidade de variância

*média de zigotos cultivados sobre o número de estruturas coletadas

**média de clivagem sobre número de zigotos cultivados

***média de blastocistos e de blastocistos eclodidos sobre o número de clivados

A influência da utilização de doadoras superovuladas uma única vez (fêmeas novas) ou submetidas a duas superovulações (placas negativas reutilizadas) pode ser observada nas Tabelas 5 e 6. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos de fêmeas submetidas a um ou dois tratamentos superovulatórios nas taxas de acasalamento, identificadas através das placas vaginais (fêmeas novas, 54%, vs. reutilizadas, 75%), de zigotos cultivados (novas, 70%, vs. reutilizadas, 56%) (Tabela 5), entre as taxas de clivagem (novas, 81%, vs. reutilizadas, 91%) e entre as taxas de blastocistos eclodidos (novas, 38%, vs. reutilizadas, 42%) (Tabela 6). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os dois grupos de fêmeas nas taxas de blastocistos ($p > 0,05$; Tabela 6).

Tabela 5: Taxa de acasalamento e produção de zigotos *Mus domesticus domesticus* de camundongas novas e reutilizadas.

Fêmeas	Superovulações N	Placas positivas		Estruturas coletadas		Zigotos cultivados*	
		N	(%)	N	(X)	N	(%)
Novas	80	43	54 ^a	2772	64	1933	70 ^a

Reutilizadas	41	31	75 ^b	1424	46	794	56 ^b
Total	121	74	61	4196	57	2727	65

^{a,b} números seguidos de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$), pelo teste do Qui-quadrado.

*% de zigotos cultivados sobre o número de estruturas coletadas

Tabela 6: Taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* de zigotos *Mus domesticus domesticus* obtidos de fêmeas novas e reutilizadas.

Fêmeas	Zigotos cultivados	Clivagem*		Blastocisto**		Blastocisto eclodido**	
	N	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Novas	1933	1559	81 ^a	931	60 ^a	591	38 ^a
Reutilizadas	794	720	91 ^b	426	59 ^a	306	42 ^b
Total	2727	2279	84	1357	60	897	39

^{a,b} números seguidos de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$), pelo teste do Qui-quadrado.

*% de clivagem sobre número de zigotos cultivados

**% de blastocistos e de blastocistos eclodidos sobre o número de clivados

A análise dos dados mostrou que não houve correlação entre o número de estruturas inviáveis, e a taxa de clivagem, de blastocistos e de blastocistos eclodidos ($p=0$). O número de estruturas inviáveis só apresentou correlação com o total de zigotos coletados ($P \neq 0$). Houve correlação significativa ($p < 0,01$) entre o total de estruturas coletadas, zigotos cultivados e taxas de clivagem, blastocisto e blastocisto eclodido (Anexo 1).

2.6. DISCUSSÃO

Um dos aspectos da ativação do oócito é a retomada do ciclo celular. O oócito ativado retoma a metáfase II interrompida, completa a meiose e libera o segundo corpúsculo polar. Logo após a fecundação os pró-núcleos são formados e tem início a síntese de DNA, resultando no final do primeiro ciclo celular e início das primeiras divisões mitóticas embrionárias (XU *et al.*,1994). No experimento de Ozgunen *et al.* (2001), oócitos apresentando o primeiro corpúsculo polar, ou os dois, são definidos como oócitos maduros com potencial de desenvolvimento ou como zigotos em desenvolvimento, respectivamente. Da mesma forma, Walton *et al.* (1983); Lehtonen e Kankondi (1987); Hamilton e Armstrong (1991) e Ertzeid e Storeng (1992) baseiam-se em parâmetros morfológicos, o que pode ser justificado pela sua praticidade, já que são empregados simultaneamente à coleta dos zigotos, evitando-se a excessiva manipulação e exposição às condições adversas do ambiente.

No presente experimento, foram selecionadas 65% das estruturas coletadas submetidas ao cultivo *in vitro*, com base nos seguintes critérios morfológicos: ausência de fragmentação, contorno regular e simétrico, zona pelúcida intacta, citoplasma homogêneo, presença de corpúsculo polar e, quando possível, visualização de pró-núcleos.

Observou-se uma substancial redução do número de estruturas coletadas, que foram submetidas ao cultivo e que alcançaram estádios embrionários posteriores. De acordo com Walton *et al.* (1983), em ratos este fenômeno ocorre possivelmente em função do fracasso da fecundação. Conforme Walton e Armstrong, (1981) e Walton *et al.* (1983), pode ser atribuída ainda, ao protocolo de superovulação ou de acordo com Bavister (2000) às condições do cultivo *in vitro*.

Licht *et al.* (1979), afirmam que a eficiência da estimulação hormonal exógena varia não só devido a idade, peso, linhagem, estado nutricional e de saúde, dose de gonadotrofina administrada, mas também devido às características individuais das fêmeas. Cultivando zigotos da linhagem OF1 em meio M16 e CZB, oriundos de protocolos de superovulação com FSH e eCG, Muñoz *et al.* (1994) mostram que o cultivo *in vitro* pode ser influenciado pela origem da gonadotrofina, dependendo do meio de cultivo usado. Em ratos o uso de gonadotrofinas exógenas, também foi associado a redução da fertilidade resultante

da excessiva estimulação folicular (Walton e Armstrong, 1981; Miller e Armstrong, 1981a,b).

Para induzir a ocorrência de um grande número de ovulações, inúmeros experimentos utilizam os protocolos de superovulação com a combinação eCG-hCG, (Wang *et al.*, 2001). Devido a longa meia-vida do eCG observada por Walton e Armstrong, (1981) nos ovários e no sangue de ratas, as diferenças na produção de oócitos e embriões, podem ser atribuídas aos fatores regulatórios negativos de secreção gonadotrófica como por exemplo a concentração de estradiol (Wang *et al.*, 2001 e Tarín *et al.* 2002). A indução da superovulação de fêmeas CF1 no presente estudo, utilizando eCG-hCG, associado ao cultivo em meio KSOM, apesar de ser eficiente, produzindo uma média de 57 (4196/74) estruturas coletadas, 37 (2727/74) zigotos cultivados por fêmea doadora, que resultou em uma taxa de 60% (1357/2279) de blastocistos, revelou também uma variação significativa entre as fêmeas doadoras em produzir embriões viáveis para o cultivo *in vitro*, para os dados dentro dos grupos, bem como entre os grupos (Tabelas 1 e 2). Com a finalidade de evitar tal variação entre as fêmeas e entre as ninhadas de cada fêmea, Chatot *et al.* (1990a) e Gardner e Lane (1996) distribuíram ao acaso os zigotos ou embriões de cada fêmea doadora entre os tratamentos.

A eficiência no desenvolvimento embrionário *in vitro* de zigotos de camundongo até o estágio de blastocisto está relacionada à linhagem e às condições de cultivo (Chatot *et al.*, 1990a e Gardner e Lane 1996). Confirmando esta observação Ménézoz *et al.* (1998) relatam que os primeiros experimentos com um único meio de cultivo, da fecundação até o estágio de blastocisto, geram resultados com uma reduzida taxa de formação de blastocistos e também reduzida taxa de implantação por blastocisto transferido. Para Bavister (2000) este fato aponta para a inadequação do meio de cultivo em proporcionar desenvolvimento adequado aos estágios embrionários iniciais. Ao contrário destas observações, os resultados do presente estudo revelam uma taxa média de 60% de blastocisto e 39% de eclosão após 120 horas de cultivo *in vitro* em meio KSOM dos zigotos CF1 de cada fêmea. Estes resultados corroboram as observações de Poueymirou *et al.* (1989), de Gardner e Lane (1996) que obtiveram 60% de desenvolvimento embrionário até blastocisto e de Wang *et al.*(2001) que alcançaram 73%.

Bachvarova e DeLeon (1980) afirmam que 30% do mRNA materno são detectados no trofotoderma e massa celular interna de blastocistos. Ratificando estes achados, Souza *et al.* (1998) relatam que a contribuição materna para o sucesso do desenvolvimento de zigotos

começa durante a oogênese com a síntese e acumulação de mRNAs e proteínas. Ménézo *et al.* (1998) afirmam que a formação do blastocisto é altamente dependente de fatores maternos e paternos, sendo associado ao baixo número de células o impacto evidente na taxa de eclosão. A análise dos dados do presente experimento revela a existência de variabilidade na produção de embriões, com a contribuição de fatores paternos e maternos. Há desigualdade de variância entre os grupos de fêmeas acasaladas com os diferentes machos, nas taxas de cultivo, clivagem, blastocisto e blastocisto eclodido ($p < 0,05$). Pode-se também observar variâncias homogêneas dentro dos grupos de fêmeas no número de embriões selecionados para o cultivo, nas taxas de clivagem e formação de blastocisto. Por outro lado, observou-se uma diferença estatística dentro dos grupos entre as taxas de eclosão dos blastocistos. Os resultados desta análise permitem destacar que mesmo existindo um potencial individual da doadora na produção de embriões, bem como na capacidade de desenvolvimento dos mesmos, esta poderá ser atenuada com o macho utilizado para o acasalamento.

Verificando a influência da utilização de doadoras superovuladas uma única vez (fêmeas novas) ou submetidas à outra superovulação (fêmeas reutilizadas), observamos que as fêmeas reutilizadas após o primeiro tratamento superovulatório, tornam-se mais suscetíveis ao segundo acasalamento (Tabela 5). Do mesmo modo, a produção de estruturas e o desenvolvimento *in vitro* podem ter divergido como consequência da eliminação no primeiro tratamento superovulatório de diferentes populações foliculares em diferentes estádios do ciclo estral (Wang *et al.*, 2001 e Tarín *et al.*, 2002).

A variabilidade entre as fêmeas observada no número e no desenvolvimento embrionário de *Mus domesticus domesticus*, da linhagem CF1, considerando-se a influência do acasalamento com diferentes machos e a reutilização das fêmeas que fracassaram no primeiro acasalamento, é resultado do potencial individual das fêmeas de um mesmo grupo experimental, em resposta à complexidade dos fatores envolvidos no tratamento superovulatório, na avaliação e seleção morfológica das estruturas coletadas e das condições do cultivo *in vitro*.

2.7. CONCLUSÃO:

Os dados obtidos no experimento permitem as seguintes conclusões:

Fêmeas *Mus domesticus domesticus* da linhagem CF1 superovuladas apresentam uma variabilidade no número de embriões produzidos, com capacidade para desenvolver-se até o estágio de blastocisto eclodido; a capacidade reprodutiva dos machos influencia o número de embriões com viabilidade de desenvolvimento produzido pelas fêmeas; e os tratamentos superovulatórios subseqüentes modificam a capacidade das fêmeas em produzir embriões competentes ao desenvolvimento *in vitro*.

3. PERSPECTIVAS

A embriologia experimental constituiu-se nos últimos 60 anos em uma ferramenta adequada, ao desenvolvimento da ciência em várias áreas do conhecimento. Experimentos realizados com gametas e embriões *Mus domesticus domesticus*, a partir da segunda metade do século passado, permitiram a organização e o funcionamento de diferentes laboratórios ao redor do mundo. Um dos aspectos fundamentais investigados pelos pesquisadores é o esclarecimento dos fenômenos biológicos da diferenciação celular. Após a fecundação, o desenvolvimento inicial do zigoto e do embrião, através das sucessivas clivagens, permite a geração e a organização do crescimento de um novo indivíduo.

No âmbito da Medicina Veterinária a embriologia experimental alcançou expressão como modelo para o desenvolvimento e a aplicação comercial das denominadas biotécnicas de reprodução, como por exemplo, a transferência, a produção *in vitro* e, mais recentemente, a clonagem de embriões das espécies domésticas de interesse afetivo e econômico. A ampla visão desta área de conhecimento permite destacar a importância do *Mus domesticus domesticus* como modelo experimental, sendo o aperfeiçoamento deste modelo no âmbito da rotina científica buscado de forma permanente pelos pesquisadores. A resposta ovariana à estimulação hormonal exógena, para a produção de um grande número de embriões competentes ao desenvolvimento pré e pós-natal, ainda hoje, apresenta-se como uma barreira intransponível. O controle da variabilidade, não somente da fisiologia ovariana, em termos de oócitos produzidos e liberados, mas também da capacidade dos embriões gerados

em desenvolverem-se a termo é o atual desafio da pesquisa científica. Experimentos devem ser desenhados para elucidar os fenômenos responsáveis pela perda da viabilidade embrionária *in vivo* e *in vitro*.

A aplicação das biotecnologias reprodutivas também tem sua importância no âmbito da produção e seleção animal. Melhorar a qualidade do produto avaliando seu potencial e ganho genético torna-se essencial em um mercado competitivo.

Por outro lado, a determinação dos efeitos das biotécnicas de reprodução sobre os outros estágios da existência dos indivíduos por elas gerados são escassos. Estudos epidemiológicos, no qual o desenvolvimento de patologias na vida adulta possam ser associados, por exemplo, à produção *in vitro* de embriões devem ser conduzidos com urgência.

Sabe-se que os fatores epigenéticos podem influenciar através da expressão de diferentes genes, a diferenciação celular e as fases posteriores do desenvolvimento embrionário e fetal. Estas alterações da expressão de genes, podem também traduzir-se por modificações do fenótipo dos indivíduos gerados. O exemplo clássico destas desordens do desenvolvimento é a síndrome dos terneiros grandes, originados pelas técnicas de clonagem. Em humanos, ao contrário das espécies animais, o reduzido peso médio ao nascimento é o indicador das patologias, com possível origem nas técnicas de reprodução assistida, como por exemplo as de origem cardíaca, pulmonar, hepática e pancreática.

Levando-se em consideração a argumentação acima, verifica-se que as perspectivas, mais promissoras no campo da pesquisa, parecem ser os tópicos da fisiologia ovariana, e do desenvolvimento embrionário e fetal.

Novas tecnologias no âmbito da genética, como por exemplo, o diagnóstico embrionário pré-implantação poderão ser empregados em conjunto com novas tecnologias, como por exemplo, na área da nanotecnologia, para selecionarem genomas de animais superiores. Neste contexto o modelo experimental utilizando o *Mus domesticus domesticus* terá sempre sua importância preservada no cenário da pesquisa científica e deverá continuar contribuindo de maneira indelével para o progresso da saúde e do bem estar da humanidade.

REFERÊNCIAS

- Aoki, F.; Worrall, D. M. and Schultz, R. M. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. **Dev. Biol** v.181, 1997 p.296-307.
- Babinet, C.; Richoux, V.; Guénet, J.L. The DDK inbred strain as a model for the study of interactions between parental genomes and egg cytoplasm in mouse preimplantation development. **Development** Supplement, 1990 p.81-87.
- Bachvarova, R. and De Leon, V. Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. **Dev. Biol** v.74, 1980 p.1-8.
- Bavister, B. D. Interactions between embryos and the culture milieu. **Theriogenology** v.53, 2000 p.619-626.
- Bavister, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Humam Reprod. Update** v.1, 1995 p.91-148.
- Bouniol, C.; Nguyen, E. and Debey, P. Endogenous transcription occurs at the 1-cell stage in the mouse embryo. **Experimental Cell Research**. v.218, 1995 p.57-62.
- Chatot, C.L.; Lewis, J.L.; Torres, I. and Ziomeck, C.A. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. **Biol. of Reprod.** v.42, 1990a p.432-440.
- Chatot, C. L.;Tasca, R.J.; Ziomek, C.A. Glutamine uptake and utilization by preimplantation mouse embryos in CZB medium. **J. Reprod. Fert.** v.89, 1990b p.335-346.
- Eppig, J.J.; O'Brien, M. J.; Pendola, F. L. and Watanabe, S. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro : follicle-stimulating hormone and insulin. **Biol. Reprod.** v.59, 1998. p.1445-1453.
- Eppig, J.J. and O'Brien, M.J. Comparison of preimplantation developmental competence after mouse oocyte growth and development in vitro and in vivo. **Theriogenology** v.49, 1998. p.415-422.
- Erbach, G.T.; La Witts, J.A.; Papioannou, V. E.; Biggers, J.D. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. **Biol. Reprod.** v.50, 1994. p.1027-1033.
- Ertzeid, G. and Storeng, R. Adverse effect of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice. **J. reprod. Fert.** v.96, 1992. p.649-655.
- Flach, G.; Johnson, M.H.; Braude, P.R.; Taylor, R.A.S. and Bolton, V.N. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. **Embo.** v.1, 1982. p.681-686.
- Fujimoto, S.; Pahlavan, N. and Dukelow, W.R. Chromosomal abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. **J. Reprod. Fert.** v.40, 1974. p.177-181.

Gardner, D.K. and Lane, M. Alleviation of the '2- cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. **Hum. Reprod.** v.11, 1996. p.2703-2712.

Hamilton, G.S.; Armstrong, D.T. The superovulation of synchronous adult rats using follicle- stimulating hormone delivered by continuous infusion. **Biol. Reprod.** v.44, 1991. p.851-856.

Kamjoo, M.; Brison, D.R. and Kimber, S.J. Apoptosis in the preimplantation mouse embryo: effect of strain difference and in vitro culture. **Mol. Reprod. And Dev.** v.61, 2002. p.67-77.

Khosla, S.; Dean, W.; Brown, D.; Reik, W. and Feil, R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. **Biol. Reprod.** v.64, 2001. p.918-926.

Lane, M. and Gardner, D.K. Inhibiting 3-phosphoglycerate kinase by EDTA stimulates the development of the cleavage stage mouse embryo. **Mol. Reprod. And Dev.** v.60, 2001. p.233-240.

Latham, K.E. and Solter, D. Effect of egg composition on the developmental capacity of androgenetic mouse embryos. **Development** v.113, 1991. p.561-568.

Latham, K.E.; Garrels, J.I.; Chang, C. and Solter, D. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. extensive reprogramming at the one- and two- cell stages. **Development** v.112, 1991. p.921-932.

Lehtonen, E. and Kankondi R. Rate of gonadotrophin- induced abnormalities in mouse ova is related to the site of hormone administration. **J. Reprod. Fert.** v.80, 1987. p.613-617.

Licht, P.; Gallo, A.B.; Aggarwal, B.B.; Farmer, S.W.; Castelino, J.B. and Papkoff, H. Biological and binding activities of equine pituitary gonadotrophins and pregnant mare serum gonadotrophin. **J. Endocrinol** v.83, 1979. p.311-322.

Mailhes, J.B.; Young, D. and London, S.N. Post ovulatory ageig of mouse oocytes in vitro and premature centromere separation and aneuploidy. **Biol. Reprod.** v.58, 1998. p.1206-1210.

Ménézo, Y.; Veiga, A. and Benkhalifa, M. Improved methods for blastocyst formation and culture. **Hum. Reprod.** v.13 suppl. 4, 1998. p.256-265.

Miller, B.G. and Armstrong, D.T. Superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin cause delayed implantation and infertility in immature rats. **Biol. Reprod.** v.25, 1981a. p.253-260

Miller, B.G. and Armstrong, D.T. Effects of a superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on ovarian function, serum estradiol, and progesterone levels and early embryo development in immature rats. **Biol. Reprod.** v.25, 1981b. p.261- 271.

Moor, R.M.; Osborn, J.C. and Crosby, I. M. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. **J. Reprod. Fert.** v.74, 1985. p.167-172.

Muñoz, I.; Rodrigues, de Sadia, C.; Gutiérrez, A.; Blaquez, M.J. and Pintado, B. Comparation of superovulatory response of mature out bred mice treated with FSH or PMSG and development potential of embryos produced. **Theriogenology** v.41, 1994. p.907-914.

Ozgunen, K.T.; Erdogan, S.; Mazmanoglu, N.; Pamuk, I.; Logoglu, G. and Ozgunen, T. Effect of gonadotrophin dose on oocyte retrieval in superovulated BALB/c mice. **Theriogenology** v.56, 2001. p.435-445.

Peters, H.; Byskov, A.G.; Himelstein- Braw, R. and Faber, M. Follicular growth : the basic event in the mouse and human ovary. **J. Reprod. Fert.** v.45, 1975. p.559-566.

Poueymirou, W.T.; Conover, J.C.; Schultz, R.M. Regulation of mouse preimplantation development differential effects of CZB medium and whitten's medium on rates and patterns of protein synthesis in 2-cell embryos. **Biol Reprod** v.41, 1989. p.317-322.

Quinn, P. and Horstman, F.C. Is the mouse a good model for the human with respect to the development of the preimplantation embryo in vitro ?. **Hum. Reprod.** v.13 Supplement 4, 1998. p.173-183.

Raz, T. and Shalgi, R. Early events in mammalian egg activation. **Hum. Reprod.** v.13 Supplement 4, 1998. p.133-145.

Renard, J.P.; Baldacci, P.; Richoux- Duranthon, V.; Pournin, S. and Babinet, C. A maternal factor affecting mouse blastocyst formation. **Develop.** v.120, 1994. p.797-802.

Souza, P.A.; Caveney, A.; Westhusin, M.E. and Watson, A.J. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. **Theriogenology** v.49, 1998. p. 115-128.

Tarín, J.J.; Albalá, S.P.; Piquer, V.G.; Hermenegildo, C. and Cano, A. Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotropin injection affects pre-implantation embryo development in vitro in the mouse. **Molecular Reprod. And Develop.** v.62, 2002. p.312-319.

Taya, K. and Watanabe G. Inhibin as a key in determining species-specific ovulation rates in mammal. In **Recent Progress in Molecular and Comparative Endocrinology**. Eds. HB Know, JMP Joss and S Ishii, p.134-143, 1999.

Walton, E.A. and Armstrong, D.T. Ovarian function and early embryo development in immature rats given a superovulatory dose of PMSG, later neutralized by antiserum. **Biol. Reprod.** v.25, 1981. p.272-280.

Walton, E.A.; Evans, G. and Armstrong, D.T. Ovulation response and fertilization failure in immature rats induced to superovulate. **J. Reprod. Fert.** v.67, 1983. p.91-96.

Wang, H.; Herath, C.B.; Xia, G.; Watanabe, G. and Taya, k. Superovulation fertilization and in vitro embryo development in mice after administration of na inhibin- neutralizing antiserun. **Reproduction** v.122, 2001. p.809-816.

Whittingham, D.G. Culture of mouse ova. **J. Reprod. Fert.** (Suppl.) v.14, 1971. p.7-21.

Xu, Z.; Kopf, G.S. and Schultz, R. M. Involvement of inositol 1,4,5- triphosphate- mediated Ca^{2+} release in early and late events of mouse egg activation. **Develop.** v.120, 1994. p.1851-1859.

ANEXO 1_ Análise de correlação dos dados resultantes do rendimento embrionário das fêmeas *Mus domesticus domesticus*.

Correlations

		estruturas	cultivados	CLIVADOS	blastocistos	ECLOSÃO	INVIAVEI
estruturas	Pearson Correlati	1.000	.769**	.666**	.524**	.454**	.633**
	Sig. (2-tailed)	.	.000	.000	.000	.000	.000
	N	80	80	80	79	79	80
cultivados	Pearson Correlati	.769**	1.000	.887**	.728**	.686**	-.008
	Sig. (2-tailed)	.000	.	.000	.000	.000	.942
	N	80	80	80	79	79	80
CLIVADC	Pearson Correlati	.666**	.887**	1.000	.867**	.837**	-.032
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.	.000	.000	.777
	N	80	80	80	79	79	80
blastocisto:	Pearson Correlati	.524**	.728**	.867**	1.000	.932**	-.065
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.	.000	.569
	N	79	79	79	79	79	79
ECLOSÃC	Pearson Correlati	.454**	.686**	.837**	.932**	1.000	-.124
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.000	.	.275
	N	79	79	79	79	79	79
INVIAVEI	Pearson Correlati	.633**	-.008	-.032	-.065	-.124	1.000
	Sig. (2-tailed)	.000	.942	.777	.569	.275	.
	N	80	80	80	79	79	80

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

ANEXO 2_ Valores totais do rendimento e desenvolvimento embrionário das fêmeas *Mus domesticus domesticus*.

fêmeas	data	macho	coleta	Hialuronid.	estruturas N	cultivados N	clivados N	blastocistos N	eclosão N	carac fê
1	23.04.02	4	1	0	59	43	39	25	13	n
2	23.04.02	1	0	1	29	10	9	3	1	n
3	23.04.02	1	1	0	35	26	26	12	11	n
4	23.04.02	2	2	1	58	58	53	7	0	n
5	23.04.02	3	1	0	35	33	28	0	0	n
6	23.04.02	2	1	1	13	12	8	0	0	n
7	30.04.02	1	1	0	41	25	21	16	16	n
8	30.04.02	4	0	1	56	56	29	28	18	n
9	30.04.02	4	0	1	57	57	4	0	0	n
10	30.04.02	2	1	0	50	33	33	32	26	n
11	30.04.02	3	1	0	62	16	16	9	2	n
12	30.04.02	4	1	0	34	26	23	17	10	n
13	03.05.02	1	2	1	25	12	2	1	0	reut
14	03.05.02	2	1	1	9	8	6	4	2	reut
15	03.05.02	1	1	0	30	14	13	11	8	reut
16	03.05.02	4	0	1	21	10	7	2	1	reut
17	03.05.02	3	1	0	19	10	8	4	2	reut
18	07.05.02	2	0	1	50	48	45	27	15	n
19	07.05.02	4	0	2	62	57	45	24	8	n
20	07.05.02	3	0	1	44	42	42	34	27	n
21	14.05.02	2	0	1	83	56	51	35	30	n
22	14.05.02	1	0	1	94	78	65	42	24	n
23	14.05.02	4	2	0	99	70	68	38	19	n
24	16.05.02	3	0	1	13	12	0	0	0	n
25	16.05.02	2	0	1	73	68	9	0	0	n
26	21.05.02	3	0	1	58	48	46	43	28	reut
27	21.05.02	1	0	0	26	13	11	6	3	reut
28	21.05.02	4	1	0	15	7	6	6	1	reut
29	21.05.02	2	0	0	38	19	19	10	4	reut
30	24.05.02	3	0	1	29	23	23	20	13	reut
31	24.05.02	4	1	0	32	21	12	1	1	reut

ANEXO 2 (continuação) _ Valores totais do rendimento e desenvolvimento embrionário das fêmeas *Mus domesticus domesticus*.

fêmeas	data	macho	coleta	Hialuronid.	estruturas N	cultivados N	clivados N	blastocistos N	eclosão N	carac fê
32	28.05.02	1	0	1	63	40	21	10	2	n
33	28.05.02	4	0	2	74	63	61	19	14	n
34	28.05.02	3	1	0	65	37	37	33	18	n
35	28.05.02	5	1	0	44	39	39	28	14	n
36	04.06.02	2	0	1	102	75	18	0	0	n
37	04.06.02	4	1	0	43	21	20	5	0	n
38	07.06.02	1	2	0	76	50	49	39	25	n
39	07.06.02	5	2	2	71	62	61	45	45	n
40	17.06.02	1	2	0	52	48	48	41	30	n
41	17.06.02	3	0	0	56	11	10	0	0	n
42	20.06.02	5	0	1	49	17	11	4	2	n
43	20.06.02	4	0	0	62	49	49	40	22	n
44	20.06.02	2	0	1	118	97	97	48	41	n
45	20.06.02	2	0	1	49	11	4	0	0	n
46	22.07.02	1	2	0	21	12	12	12	8	reut
47	22.07.02	2	1	0	41	36	36	11	9	reut
48	22.07.02	3	0	1	107	57	38	0	0	reut
49	22.07.02	4	1	2	48	45	45	33	25	reut
50	22.07.02	5	2	2	60	35	35	31	24	reut
51	25.07.02	4	2	1	25	14	14	5	1	reut
52	25.07.02	5	1	1	87	71	71	42	38	reut
53	29.07.02	1	1	0	8	8	8	8	8	reut
54	29.07.02	2	2	1	52	14	12	0	0	reut
55	29.07.02	4	1	0	37	17	17	14	6	reut
56	29.07.02	5	2	2	75	51	51	46	39	reut
57	01.08.02	1	0	1	54	3	2	0	0	reut
58	01.08.02	2	0	1	70	10	4	0	0	reut
59	01.08.02	4	1	0	29	7	6	0	0	reut
60	01.08.02	5	1	0	82	71	71	63	47	reut
61	01.08.02	3	1	1	57	15	14	0	0	reut

ANEXO 2 (continuação) _ Valores totais do rendimento e desenvolvimento embrionário das fêmeas *Mus domesticus domesticus*.

fêmeas	data	macho	coleta	Hialuronid.	estruturas	cultivados	clivados	blastocistos	eclosão	carac
					N	N	N	N	N	f
62	05.08.02	1	0	2	61	25	25	16	9	re
63	05.08.02	2	1	0	37	23	20	10	9	re
64	05.08.02	4	1	1	45	3	0	0	0	re
65	05.08.02	5	2	1	126	92	86	27	20	re
66	12.08.02	1	1	0	70	40	37	21	18	
67	12.08.02	2	1	0	67	58	58	41	38	
68	12.08.02	4	1	2	72	65	64	27	22	
69	12.08.02	5	1	1	41	18	18	8	6	
70	15.08.02	2	1	0	99	78	69	67	25	
71	15.08.02	4	2	1	97	59	43	40	11	
72	29.08.02	1	0	1	150	36	10	0	0	
73	29.08.02	4	1	0	93	45	40	15	6	
74	29.08.02	5	1	1	112	88	81	51	32	
Total					4196	2727	2279	1357	897	
Média					57	37	31	19	12	
%						65%	84%	60%	39%	

LEGENDA:

COLETA:

Ampola:0

Oviduto:1

ampola/oviduto:2

HIALURONIDASE:

Não:0

Sim:1

Alguns:2

ANEXO 3 _ Protocolo
Luciane P. C. Baptista

1-Protocolo de Superovulação e Cultivo de Embriões de Camundongas

Fêmeas doadoras: eCG: Machos:
 Nº: hCG: 1 2 3
 Novas Reutilizadas Placas: 4 5

2-Coleta / Data:

Fêmea	Macho	Int.abate.civ min	Hialuronidas e	Coleta local	Coleta N	Cultivo N	Observação
_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____

3-Avaliação do desenvolvimento embrionário:

Clivagem:						<u>Placa1</u>			<u>Placa2</u>		
<u>Placa1</u>			<u>Placa2</u>			♀	N	%	♀	N	%
♀	N	%	♀	N	%	_____	_____	()	_____	_____	()
_____	_____	()	_____	_____	()	_____	_____	()	_____	_____	()
_____	_____	()	_____	_____	()	_____	_____	()	_____	_____	()
_____	_____	()	_____	_____	()	_____	_____	()	_____	_____	()
_____	_____	()	_____	_____	()	_____	_____	()	_____	_____	()

Eclosão:						OBS:		
<u>Placa1</u>			<u>Placa2</u>					
♀	N	%	♀	N	%			
_____	_____	()	_____	_____	()			
_____	_____	()	_____	_____	()			
_____	_____	()	_____	_____	()			
_____	_____	()	_____	_____	()			

Blastocisto:

ANEXO 4_ Meio de cultivo KSOMComposição do meio de cultivo simplificado acrescido de K⁺ (KSOM)

	100μL	PM	mM
NaHCO ₃	0,210g	84.02	95.0
NaCl	0,5553g	58.46	2.5
KCl	0,0186g	74.56	1.71
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,0251g	147.02	0.2
Piruvato de Sódio	0,0022g	110.00	0.2
Glicose	0,0036g	180.02	0.01
EDTA	0,0003g	372.25	1.0
Glutamina	0,0146g	146.10	0.01(g/l)
Vermelho Fenol	0,0010g	-	-
Lactato de Sódio	85 μL	112.10	10.0
Penicilina G	0,0059g	-	100 (U/mL)
SO ₄ Streptomicina	0,0050g	-	50 (Ug/mL)
KH ₂ PO ₄	0,0047g	136.09	0.35
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,0049g	-	0.2
HEPES	0,5962g	238.3	25

No momento do uso, deve ser adicionado 0,4 mg de BSA para cada 10 ml de KSOM. O pH deve ser de 7,1–7,2, e osmolaridade entre 270-290 m osm.