

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**VIABILIDADE *in vitro* APÓS VITRIFICAÇÃO DE  
BLASTOCISTOS DE *Mus domesticus domesticus*  
CULTIVADOS A PARTIR DE EMBRIÕES DE 1-CÉLULA**

**Leandro Francisco Basile**

Curitiba, 18 de Maio de 1999.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**VIABILIDADE *in vitro* APÓS VITRIFICAÇÃO DE  
BLASTOCISTOS DE *Mus domesticus domesticus*  
CULTIVADOS A PARTIR DE EMBRIÕES DE 1-CÉLULA**

**Leandro Francisco Basile<sup>1</sup>**

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre  
em Ciências Veterinárias, Área de  
Concentração Patologia Veterinária

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues<sup>2</sup>

Curitiba, 18 de Maio de 1999.

---

<sup>1</sup> Médico Veterinário. Aluno do CPGCV da UFPR.

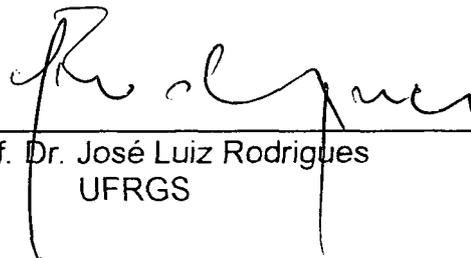
<sup>2</sup> Professor Titular do Departamento de Patologia Animal da FAVET da UFRGS.

LEANDRO FRANCISCO BASILE

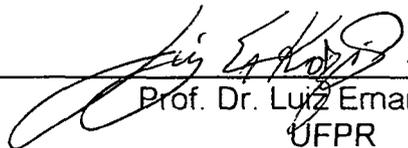
VIABILIDADE *in vitro* APÓS VITRIFICAÇÃO DE  
BLASTOCISTOS DE *Mus domesticus domesticus*  
CULTIVADOS A PARTIR DE EMBRIÕES DE 1-CÉLULA

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de **MESTRE** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná em 18 de Maio de 1999, pela Comissão formada pelos professores:

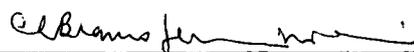
Orientador:



Prof. Dr. José Luiz Rodrigues  
UFRGS



Prof. Dr. Luiz Emandes Kozicki  
UFPR



Prof.ª Dr.ª Clotilde de Lourdes Branco Germiniani  
UFPR

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha existência.

Ao meu pai, João Roberto Basile por todo o amor, carinho, compreensão e apoio, expresso meu sincero agradecimento e admiração.

À minha mãe e irmã, Rita Maria e Luciana pelo companheirismo e estímulo em traçar meu caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Luiz Rodrigues pela forma como fui acolhido em seu laboratório, pelo exemplo e orientação no sentido de uma formação profissional e científica que prima pela ética, honestidade, senso crítico, criatividade, responsabilidade, dedicação e, principalmente, pela cessão de todo o material necessário à realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução: Alexandre Tavares de Oliveira, Consuelo Garrastazú Paixão Côrtes, Elisabeth Obino Cirne Lima, Juliano Kummer, Luisa Maria Gomes de Macedo Braga, Paulo Ricardo Lopes Aguiar, Ricardo Marques de Azambuja e Rui Fernando Félix Lopes pelo auxílio e amizade.

Aos estagiários e bolsistas deste Laboratório, Alexandre Rocha Lima, Marcelo Göcks, Marcos Soares Duarte e Fernanda Hoffmann Apollo pelo auxílio na execução dos experimentos.

Em especial, aos colegas e amigos, Ana Angélica Gratão e Andreimar Chaves do Vale pelo companheirismo em todos os momentos, até à confecção deste documento.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, na pessoa da Prof. Dr. Clotilde de Lourdes Branco Germiniani pelo apoio e estímulo constante.

À todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram ou participaram para a realização de mais esta etapa da minha vida, remeto meus mais sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1. CULTIVO <i>in vitro</i> DE EMBRIÕES MAMÍFEROS .....	4
2.2. BLOQUEIO DE DESENVOLVIMENTO .....	6
2.2.1. Fatores genéticos .....	6
2.2.2. Componentes dos meios .....	7
2.2.3 Condições de cultivo.....	11
2.3. EQUILÍBRIO NAS SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS.....	13
2.4. VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES <i>Mus domesticus domesticus</i> .....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
3.1. LOCAL.....	18
3.2. MATERIAL.....	18
3.2.1. Animais .....	18
3.2.2. Hormônios .....	20
3.2.3. Meios de colheita e de cultivo.....	20
3.2.4. Soluções crioprotetoras .....	22
3.3. MÉTODOS.....	23
3.3.1. Fase 1.....	23
3.3.1.1. Sincronização do ciclo estral e superovulação das doadoras. ....	23
3.3.1.2. Colheita dos embriões e classificação morfológica.....	24
3.3.1.3. Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	25
3.3.2 Fase 2.....	26
3.3.2.1. Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	26
3.3.2.2. Viabilidade após exposição às soluções de vitrificação.....	26
3.3.2.3. Viabilidade após vitrificação.....	27

3.3.3. Metodologia estatística .....	28
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1. FASE 1 .....	30
4.1.1. Meios de cultivo .....	30
4.1.2. Fontes proteicas .....	30
4.1.3. Tampão iônico .....	31
4.1.4. Influência da glicose .....	32
4.2. FASE 2 .....	33
4.2.1. Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	33
4.2.2. Viabilidade após exposição às soluções crioprotetoras .....	34
4.2.3. Viabilidade após vitrificação.....	35
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>
ANEXO .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACE	-	Acetamida
ATP	-	Adenosina tri-fosfato
Be	-	Blastocisto eclodido
Bj	-	Blastocisto jovem
BI	-	Blastocisto
BMOC-2	-	Meio de Brinster para cultivo de ovócitos
BSA	-	Albumina sérica bovina
Bx	-	Blastocisto expandido
CZB	-	Meio de cultivo de Chatot, Bavister e Ziomek
DMSO	-	Dimetil sulfóxido
eCG	-	Gonadotrofina coriônica eqüina
EDTA	-	Etileno diamino tetracético
EF	-	Etileno glicol + Ficoll
EFS	-	Etileno glicol + Ficoll + Sacarose
EG	-	Etileno glicol
GLI	-	Glicose
GLI-6P	-	Glicose 6-fosfato
GLU	-	Glutamina
GLY	-	Glicerol
h	-	hora (s)
hCG	-	Gonadotrofina coriônica humana
HEPES	-	N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
HTF	-	Fluido tubárico humano
K <sup>+</sup>	-	Potássio
KRB	-	Bicarbonato de Kreb's Ringer
KSOM	-	Meio de cultivo simplificado acrescido de K <sup>+</sup>
M	-	Molar
Mc	-	Mórula compacta
ml	-	mililitro (s)
Mo	-	Mórula

mOsmol/kg	-	Osmolaridade
N <sub>2</sub> L	-	Nitrogênio líquido
OPS	-	Método de vitrificação com palheta esticada
P <sub>i</sub>	-	Fosfato intracelular
P <sub>e</sub>	-	Fosfato extracelular
PBS	-	Solução salina tamponada
PEG	-	Poliétileno glicol
PG	-	Propileno glicol
pH	-	Potencial hidrogeniônico
PVA	-	Álcool polivinílico
PVP	-	Polivinilpirrolidona
s	-	segundo (s)
SAC	-	Sacarose
SCE	-	Solução de criopreservação extracelular
SCI	-	Solução de criopreservação intracelular
SFB	-	Soro fetal bovino
SFBi	-	Soro fetal bovino inativado
SOF	-	Fluido sintético de oviduto
SOM	-	Meio de cultivo simplificado
TCM	-	Meio de cultivo celular
TL	-	Meio de Tyrode acrescido de lactato
TLP	-	Meio de Tyrode acrescido de lactato e piruvato
VS1	-	Solução de vitrificação 1
VS2	-	Solução de vitrificação 2
1,2-PPD	-	1,2-Propanodiol
1,3-BUT	-	1,3-Butanediol
μl	-	microlitro (s)
°C	-	graus Celsius

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição (mM) dos meios de cultivo. Porto Alegre, 1999.....	21
TABELA 2. Desenvolvimento de embriões de 1-célula de <i>Mus domesticus domesticus</i> nos meios CZB, HTF e KSOM suplementados com 20% de SFB. Porto Alegre, 1999.....	30
TABELA 3. Desenvolvimento de embriões de 1-célula de <i>Mus domesticus domesticus</i> no meio KSOM suplementado com 20% de SFB ou 4mg/mL de BSA. Porto Alegre, 1999. ....	31
TABELA 4. Desenvolvimento de embriões de 1-célula de <i>Mus domesticus domesticus</i> nos meios HTF e KSOM suplementados com 4mg/mL de BSA e 20 e 25mM de HEPES, respectivamente. Porto Alegre, 1999. ....	32
TABELA 5. Desenvolvimento de embriões de 1-célula de <i>Mus domesticus domesticus</i> nos meios HTF e KSOM suplementados com BSA e HEPES com presença da glicose a partir de 24h do início do cultivo. Porto Alegre, 1999 .....	32
TABELA 6. Desenvolvimento de embriões de 1-célula de <i>Mus domesticus domesticus</i> nos meios HTF e KSOM suplementados com BSA e HEPES com presença da glicose a partir de 48h do início do cultivo. Porto Alegre, 1999 .....	33
TABELA 7. Desenvolvimento de embriões de 1-célula de <i>Mus domesticus domesticus</i> nos meios HTF e KSOM suplementados com 20 e 25mM de HEPES, respectivamente. Porto Alegre, 1999. ....	34
TABELA 8. Viabilidade embrionária <i>in vitro</i> após exposição às soluções de vitrificação de blastocistos de <i>Mus domesticus domesticus</i> cultivados a partir de embriões 1-célula no meio KSOM. Porto Alegre, 1999. ....	34
TABELA 9. Viabilidade embrionária <i>in vitro</i> após vitrificação de blastocistos de <i>Mus domesticus domesticus</i> cultivados a partir de embriões 1-célula no meio KSOM. Porto Alegre, 1999.....	35

## RESUMO

### VIABILIDADE *in vitro* APÓS VITRIFICAÇÃO DE BLASTOCISTOS DE *Mus domesticus domesticus* CULTIVADOS A PARTIR DE EMBRIÕES DE 1-CÉLULA.

Foram realizados três experimentos para se avaliar o desenvolvimento *in vitro* de blastocistos de *Mus domesticus domesticus* (CF1xSWISS) cultivados a partir de embriões de 1-célula, após exposição e vitrificação em solução crioprotetora contendo 9,0M de EG acrescido ou não de 0,3M de SAC.

No experimento 1, após o cultivo de 755 embriões de 1-célula, foram observadas taxas de eclosão de 53,0% para o meio HTF e de 61,7% para o meio KSOM ( $P>0,05$ ), suplementados com 4mg/ml de BSA + 20 e 25mM de HEPES.

No experimento 2 testaram-se os possíveis efeitos tóxicos das soluções crioprotetoras propostas: VS1 = 1,8M EG em PBS + 6%BSA (60s) seguido de 9,0M EG em PBS + 6%BSA (imersão direta) e VS2 = 9,0M EG + 0,3M SAC em PBS + 6%BSA (imersão direta) em 152 blastocistos cultivados a partir de embriões de 1-célula em meio KSOM com 25mM de HEPES. Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os grupos controle (86,0%), VS1 (82,3%) e VS2 (78,4%).

No experimento 3, 140 blastocistos cultivados por 72h em meio KSOM com 4mg/ml de BSA e 25mM de HEPES foram vitrificados em palhetas de 0,25ml modificadas (OPSm) nas soluções crioprotetoras acima descritas, alcançando taxas de eclosão de 45,7 e 41,4% para VS1 e VS2 ( $P>0,05$ ), respectivamente. Portanto, concluiu-se que ambos os meios, HTF e KSOM acrescidos de BSA e HEPES, proporcionaram o completo desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Apesar de não ter ocorrido diferença estatística ( $P>0,05$ ), no meio KSOM observou-se que os embriões tiveram uma curva de crescimento mais homogênea e melhores taxas de eclosão, representando mais uma alternativa para o cultivo de embriões de 1-célula. Igualmente, não houve variação significativa ( $P>0,05$ ) nas taxas de eclosão para os blastocistos de *Mus domesticus domesticus* vitrificados nas soluções crioprotetoras contendo 9,0M de EG com ou sem o acréscimo de 0,3M de SAC.

## ABSTRACT

### ***In vitro* VIABILITY AFTER VITRIFICATION OF *Mus domesticus domesticus* BLASTOCYSTS CULTURED FROM ONE-CELL.**

Three experiments were carried out in order to evaluate the *in vitro* development of *Mus domesticus domesticus* (CF1 x SWISS) blastocysts cultured from one-cell embryos after exposition and vitrification in a cryoprotectant solution composed of 9.0M EG added or not of 0.3M SAC.

In the first experiment, after the culture of 755 one-cell embryos, were observed the hatching rates of 53.0% for HTF medium and 61.7% for KSOM medium ( $P>0.05$ ) supplemented with 4mg/ml BSA + 20 and 25mM HEPES, respectively.

In the second experiment were evaluated the capacity of the embryos to hatching after exposition to the cryoprotectant solutions proposed (VS1 = 1.8M EG in PBS + 6% BSA (120s) followed by 9.0M EG in PBS + 6% BSA and VS2 = 9.0M EG + 0.3M SAC in PBS + 6% BSA). First the embryos were cultured from one-cell to blastocyst stage and after 152 blastocysts were exposed to the vitrification solutions (VS1 and VS2). The exposition didn't showed significant difference ( $P>0.05$ ) among the control (86.0%), VS1 (82.3%) and VS2 (78.4%) groups.

In the third experiment 140 blastocysts cultured for 72h in KSOM with 4mg/ml BSA + 25mM HEPES were vitrified in 0.25ml modified straws (OPSm) in the cryoprotectant solutions previously described, reaching hatching rates of 45.7 and 41.4% in VS1 and VS2 ( $P>0.05$ ), respectively. Then, it was concluded that both, HTF and KSOM + BSA and HEPES produced a complete *in vitro* preimplantation embryos development.

However, the embryos cultured in KSOM medium showed a homogeneous growing curvature and higher hatching rates, which can be another alternative for culture of one-cell embryos. Equally, there were no differences ( $P>0.05$ ) in the hatching rates between *Mus domesticus domesticus* vitrified blastocysts in cryoprotectant solutions containing 9.0M EG with or without the addition of 0.3M SAC.

## 1. INTRODUÇÃO

O crescente aumento demográfico da população mundial e a demanda proporcional para o incremento na produção de proteína animal têm estimulado o desenvolvimento de novas biotecnologias que permitam acelerar o melhoramento genético de rebanhos e, conseqüentemente, a produtividade das espécies de interesse econômico. Da mesma forma, podemos utilizar estas tecnologias (transferência de embriões, fecundação *in vitro*, clonagem e transferência nuclear) para a preservação de espécies selvagens em perigo de extinção.

Por ser uma biotécnica que suporta os mais diversos experimentos com embriologia, o cultivo *in vitro* de embriões mamíferos no período de pré-implantação alcançou um considerável progresso na última década. Porém, somente em algumas espécies foi possível o desenvolvimento *in vitro* a partir do estágio de 1-célula a blastocisto eclodido (Be).

Atualmente, o modelo experimental *Mus domesticus domesticus* é ainda amplamente utilizado nos trabalhos desenvolvidos no cultivo *in vitro* de embriões mamíferos. As vantagens apresentadas são a facilidade de indução da superovulação e da sincronização do ciclo estral, com a obtenção de um grande número de embriões com uniformidade morfológica em todos os estádios de desenvolvimento num curto espaço de tempo a um baixo custo. O conhecimento das necessidades nutritivas para o sucesso do

desenvolvimento *in vitro* de embriões *Mus domesticus domesticus* a partir do estágio de 1-célula até blastocisto (BI) é bastante limitado e, como consequência, faz-se necessário um ajuste nos elementos constituintes da formulação dos meios quimicamente definidos.

Da mesma forma, a criopreservação por vitrificação oferece perspectivas bastante promissoras, em particular para os embriões produzidos *in vitro* e transgênicos. Enquanto os métodos clássicos utilizados para a congelação de embriões necessitam de equipamento apropriado, o método de vitrificação não requer material específico, reduzindo os investimentos, e consequentemente, o custo dos embriões. Após o envase, os embriões são imediatamente imersos em nitrogênio líquido, reduzindo o tempo de exposição ao crioprotetor e permitindo desta forma, uma congelação ultra-rápida sem a formação de cristais de gelo intra e extra celulares.

O etileno glicol (EG) além de apresentar baixa toxicidade, possui um peso molecular inferior aos demais crioprotetores, proporcionando uma rápida permeação para o interior das células durante um curto período de exposição e, consequentemente, uma rápida remoção após o aquecimento. A diminuição do período de exposição ao crioprotetor, previne as injúrias de origem tóxica e osmótica.

A criopreservação de embriões cultivados *in vitro* irá proporcionar a conservação *ad perpetuum* de genomas selecionados, a importação e exportação de animais de forma econômica e sem riscos sanitários. Hoje, os experimentos com crioconservação de embriões mamíferos possuem como objetivo tornar a técnica mais simples, econômica e eficiente.

Diante do acima exposto, a presente pesquisa teve por objetivos:

- a) a avaliação comparativa entre os meios CZB, HTF e KSOM suplementados com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA) e acrescidos ou não de HEPES, na viabilidade *in vitro* de embriões de 1-célula de *Mus domesticus domesticus* (CF1x SWISS) cultivados por 120h;
- b) a determinação da viabilidade (taxa de eclosão) de BI de *Mus domesticus domesticus* (CF1x SWISS) cultivados *in vitro* a partir do estágio de 1-célula e expostos às soluções VS1 (1,8M de EG + 6% de BSA em PBS por 120s seguida da solução de 9,0M de EG + 6% de BSA em PBS) e VS2 (9,0M de EG + 0,3M SAC + 6% de BSA em PBS);
- c) a determinação da viabilidade (taxa de eclosão) de BI de *Mus domesticus domesticus* (CF1x SWISS) cultivados *in vitro* a partir do estágio de 1-célula após a vitrificação nas soluções crioprotetoras descritas acima.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. CULTIVO *in vitro* DE EMBRIÕES DE MAMÍFEROS

Foi Hammond em 1949, quem deu início ao cultivo *in vitro* de embriões de mamíferos, cultivando embriões de camundongos do estágio de 8-células à BI em solução salina acrescida de gema de ovo. Porém, o primeiro meio de cultivo elaborado especificamente para embriões de mamíferos foi descrito por Whitten (1956), utilizando meio KRB (Bicarbonato de Krebs Ringer) + BSA em 5% CO<sub>2</sub>.

Biggers; McLaren (1958) cultivaram embriões de camundongos despigmentados de 8-células à BI que foram transferidos para receptoras pigmentadas, obtendo os primeiros fetos nascidos a partir de embriões cultivados *in vitro*.

Brinster (1965; 1967) acrescentando piruvato e lactato ao meio BMOC-2 (Meio de Brinster para cultivo de ovócitos), conseguiu o desenvolvimento de embriões de 1-célula até 2-células em camundongos (SWISS).

Edwards *et al.* (1969, 1970) iniciaram os primeiros estudos com embriões de humanos fertilizados *in vitro* e cultivados em meios semi-definidos suplementados com BSA ou SFB.

A partir de 1970, inúmeras pesquisas foram desenvolvidas em diferentes espécies de mamíferos cuja somatória dos conhecimentos acumulados até o início da década de 90 permitiu a formulação de meios de cultivo que proporcionaram o completo crescimento *in vitro*, de embriões de 1-célula até Be (Gardner; Leese, 1990).

Quinn *et al.* (1985) elaboraram o meio HTF (Fluido tubárico humano) baseado na composição do fluido de oviduto humano.

Chatot *et al.* (1989) promoveram modificações no meio BMOC-2, denominando-o CZB (Meio de cultivo de Chatot, Bavister e Ziomek). O cultivo contínuo de embriões de 1-célula (CF1xB6SJLF1/J) neste meio resultou em 83% de embriões de 4-células e 9% de BI. Dos embriões cultivados em meio sem glicose (GLI), que receberam 5,5mM de GLI após 48h de cultivo, 57% deles desenvolveram-se até BI.

Chatot *et al.* (1990), estudando o consumo da glutamina (GLU) e da GLI no cultivo de embriões de 1-célula (CF1xB6SJLF1/J) em meio CZB, obtiveram 71% de BI, injetando a GLI nas microgotas após 48h de cultivo.

Erbach *et al.* (1994), aumentando as concentrações de K<sup>+</sup> (2,5mM) e de Na<sup>+</sup> (95mM) do meio SOM (Meio de cultivo simplificado), alcançaram 100% de Mo (Mórula) e 88% de BI, a partir do cultivo de embriões de 1-célula (CF1xB6SJLF1/J).

Para Summers *et al.* (1995), o cultivo de embriões de 1-célula (CF1) em meio KSOM (Meio de cultivo simplificado acrescido de  $K^+$ ), proporcionou taxas de 85 a 90% de BI nas concentrações de 0,2 a 5,56mM de GLI.

O'Neill (1997) cultivou embriões de 1 e 2-células (SWISS) *Mus domesticus domesticus* nos meios HTF e HTFm (HTF + 0,11mM EDTA + 1M GLU) alcançando taxas de 80 e 92% de BI, respectivamente.

## 2.2. BLOQUEIO DE DESENVOLVIMENTO

### 2.2.1. Fatores genéticos

Whitten; Biggers (1968), cultivando embriões de 1-célula de camundongos F1 (C57B1/10jxSjL/J) em meio KRB, obtiveram 75% de BI. Em contraste, no mesmo experimento, quando cultivaram embriões de linhagens heterogênicas (SjL/J, C57, 129, SWISS) as taxas de BI foram de 3, 18, 17 e 0%, respectivamente.

Whittingham (1971a) relatou que alguns cruzamentos de camundongos apresentavam bloqueio de desenvolvimento e outros não, evidenciando a possível participação de um componente genético.

Muggleton-Harris *et al.* (1982) e Pratt; Muggleton-Harris (1988), transferindo o citoplasma de embriões de linhagens sem bloqueio para

embriões de linhagens com bloqueio, conseguiram ultrapassar o bloqueio de 2-células.

Bensaude *et al.* (1983) e Telford *et al.* (1990) apontaram a ativação do genoma embrionário no final do estágio de 2-células sobre o genoma materno como responsável pelo bloqueio de 2-células.

Para Goddard; Pratt (1983), com exceção de algumas linhagens isogênicas e cruzamentos F1, o cultivo *in vitro* de embriões de *Mus domesticus domesticus* apresentou o chamado bloqueio de 2-células.

#### 2.2.2. Componentes dos meios

Brinster (1965) recomendou o cultivo *in vitro* de embriões pré-implantação em pH entre 7,10 e 7,20.

Whittingham (1969) ultrapassou o estágio de 1-célula em embriões de camundongos aumentando a concentração de BSA de 1 para 4mg/ml.

Caro; Trounson (1984), avaliando os diversos efeitos da utilização de BSA, SFB ou de nenhuma proteína no meio de cultivo, não encontraram diferença no cultivo *in vitro* de embriões de murinos.

Para Thomassen (1989), a presença da BSA pode estimular ou inibir a proliferação e o crescimento celular conforme a pureza química e a concentração utilizada.

Fitzgerald; Di Mattina (1992), num estudo comparativo para avaliar a capacidade dos meios CZB e Earle's no desenvolvimento *in vitro* de embriões de humanos, observaram a diminuição da sobrevivência embrionária quando adicionaram soro às formulações.

Para Maurer (1992), o SFB tanto pode oferecer fatores benéficos ao cultivo, tais como: substratos energéticos, aminoácidos, vitaminas e fatores de crescimento, quanto pode ser tóxico aos embriões, dependendo da espécie animal e do estágio de desenvolvimento.

Yoshioka *et al.* (1997) observaram um aumento significativo na formação de BI (60 para 87%) e na taxa de eclosão (29,6 para 44,3%), quando substituíram 3mg/ml de BSA por 5% de SFB, respectivamente, no cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* em meio SOF (Fluido sintético de oviduto).

Zigler *et al.* (1985), estudando o efeito tamponante do HEPES [N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)] sobre meios de cultivo, observou que quando expostos à luz, o HEPES estimula a produção de produtos citotóxicos.

Wüttke; Walz (1990), pesquisando a regulação do pH intracelular em camundongos, demonstraram que o tampão iônico HEPES apresenta efeito tamponante superior ao do bicarbonato de sódio.

Montagner *et al.* (1998) enfatizaram o uso do tamponante HEPES no cultivo de embriões de bovinos produzidos *in vitro*, com o intuito de compensar os danos causados por variações de pH, proporcionando incremento e uniformidade no desenvolvimento embrionário.

Hammond (1949) e Whitten (1956) foram os primeiros a utilizar a GLI como substrato energético para o desenvolvimento *in vitro* de embriões de mamíferos.

Hsieh *et al.* (1979) e Chi *et al.* (1988) pesquisaram o perfil das enzimas presentes nos diversos estádios embrionários no cultivo *in vitro* de embriões de humanos e murinos para avaliar como e onde era feito o consumo da GLI e sua interrelação com o bloqueio de 2-células em camundongos.

Vários autores consideraram a presença de GLI durante as primeiras 3 clivagens (72h) como um dos fatores responsáveis pelo bloqueio de 2-células (Goddard; Pratt, 1983; Chatot *et al.*, 1989, 1990; Lawitts; Biggers, 1991; Sakkas *et al.*, 1993).

Os mecanismos que controlam os efeitos adversos da GLI no desenvolvimento pré-implantação *in vitro* de embriões de camundongos ainda são desconhecidos (Bavister, 1988). A interação da GLI com alguns componentes dos meios utilizados: NaCl, GLU, aminoácidos, fosfato, lactato e piruvato, define o efeito inibitório ou não sobre o cultivo (Chatot *et al.*, 1990; Seshagiri, Bavister, 1991; Ho *et al.*, 1995; Summers *et al.*, 1995; Leppens-Luisier; Sakkas, 1997).

Schini; Bavister (1988) estudaram o efeito da variação na concentração da GLI (0,0; 0,1; 0,5 e 5,0mM) no meio TLP-PVA (Meio de Tyrode acrescido de lactato e piruvato - álcool polivinílico) acrescido de aminoácidos para o cultivo de embriões de 2-células de hamster. No meio sem GLI, 27,2% dos embriões ultrapassaram o bloqueio e nos demais, apenas 4,7%.

Chatot *et al.* (1989, 1990) e Brown; Whittingham (1992) verificaram que nos embriões provenientes de linhagens heterogênicas, a GLI inibe o desenvolvimento nas primeiras 48 horas de cultivo *in vitro*, sendo fundamental ao crescimento somente após a compactação.

Seshagiri; Bavister (1991), estudando o 'Efeito Crabtree' (Crabtree, 1929) em embriões de hamster, demonstraram que a presença da GLI e/ou fosfato em meio TL-PVA para o cultivo *in vitro* a partir de 8-células promoveu

um pronunciado decréscimo no consumo de oxigênio, com redução da atividade respiratória e do metabolismo oxidativo em torno de 56%.

Conaghan *et al.* (1993), mensurando o consumo de GLI e/ou piruvato em embriões de humanos 1-célula cultivados até BI em meio de Earle, obtiveram 59% de BI no grupo controle e 16% no grupo contendo GLI ( $P < 0,02$ ).

Leppens-Luisier; Sakkas (1997), estudando a adaptabilidade da capacidade de desenvolvimento *in vitro* de embriões de murinos na ausência de GLI (diferentes períodos), encontraram melhores resultados quando cultivaram embriões de 1-célula (OF1) em meio M16 sem GLI no intervalo entre 24 e 48h (54%) e a partir de 24h (44%) após o início do cultivo.

### 2.2.3. Condições de cultivo

A qualidade da água é um dos pontos mais importantes na preparação de meios de cultivo, sendo recomendado o uso de água tridestilada (Whittingham, 1971a; Hogan *et al.*, 1986) ou água purificada por filtração (Hogan *et al.*, 1986).

Segundo Hafez (1995), os processos de deionização, osmose invertida, absorção carbônica e micro-filtração em membrana são algumas das vantagens do sistema MilliQ sobre a destilação.

Abramczuk *et al.* (1977) recomendou a adição de 100 $\mu$ M EDTA (Etileno diamino tetracético) aos meios de cultivo à base de água bidestilada, para prevenir prováveis contaminações por metais pesados devido ao armazenamento por tempo prolongado.

Van Winkle *et al.* (1990) e Dawson; Baltz (1997) observaram que embora o fluido do oviduto de camundongas apresente osmolaridade em torno de 360mOsm/Kg, valores acima de 300mOsm/Kg são deletérios ao desenvolvimento *in vitro* de embriões de 1-célula. Para Lawitts; Biggers (1991), Biggers *et al.* (1993) e Dawson; Baltz (1997), a osmolaridade ideal deve oscilar entre 270 a 290mOsm/Kg.

Concentrações de 1 a 5% de CO<sub>2</sub> são suficientes para o desenvolvimento *in vitro* de embriões de camundongos na fase de pré-implantação, por fornecer uma condição semelhante àquela encontrada no fluido do oviduto e no lúmen do útero de camundongas prenhes (Whittingham, 1971a).

Bavister (1995) afirmou que o sucesso do cultivo *in vitro* de embriões de *Mus domesticus domesticus* a partir do estágio de 1-célula até Be, sofre a influência de fatores diversos, como: pessoal técnico, treinamento, condições de cultivo, equipamentos e, o mais importante, qualidade dos embriões.

### 2.3. EQUILÍBRIO NAS SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS

Ishimori *et al.* (1992b), estudando os efeitos do tempo de exposição de BI de camundongos à solução VSI composta por 4,5M EG + 3,4M DMSO (Dimetil sulfóxido), alcançaram taxas de sobrevivência de 100, 100, 79, 13, 15 e 0% para 0, 1, 2, 3, 4 e 5min de exposição, respectivamente. As taxas de sobrevivência dos embriões após 3, 4 e 5min de exposição foram significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) ao grupo controle.

Valdez *et al.* (1992) expôs BI de camundongos à diversas associações de crioprotetores: glicerol (GLY), propilenoglicol (PG), EG e DMSO em diferentes concentrações (10, 20, 30 e 40% v/v). Os embriões expostos à solução VSv, composta por 20% EG + 20% DMSO + 10% 1,3-BUT (Butanodiol) por 30s, sofreram o menor efeito tóxico, com 95,4% de viabilidade. Quando utilizou o método 'two-step', os embriões foram equilibrados por 3min numa solução de 50% VSv, e então transferidos para VSv por 30s, aumentando a viabilidade para 96,2% ( $P > 0,05$ ).

Zhu *et al.* (1993) não encontraram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) nas taxas de sobrevivência de blastocistos expandidos (Bx) de camundongos expostos às soluções de vitrificação EFS (EG + FICOLL + sacarose)<sub>20</sub> (100, 100 e 100%) e EFS<sub>30</sub> (100, 100 e 95%) por 2, 5 e 10min, respectivamente. Porém, os embriões expostos à solução EFS<sub>40</sub>

apresentaram taxas de sobrevivência inferiores ( $P < 0,01$ ) às demais, com 90, 18 e 30%.

Cseh *et al.* (1998) submeteram BI de camundongos à solução de vitrificação composta por 3M EG + 0,25M SAC (sacarose) + 10% SFB por 20min à 24°C, registrando taxas de re-expansão de 93% no grupo tratado e 98% no grupo controle ( $P > 0,05$ ).

Paixão Côrtes (1998) observou que BI *Mus domesticus domesticus* equilibrados por 2min em 1,8M EG + 6% BSA e expostos por 30s em 9,0M EG + 6% BSA (VSI) ou expostos por 30s em 9,0M EG + 6% BSA + 0,3M SAC (VSIIS) alcançaram 91 e 90% de sobrevivência embrionária, não apresentando diferença significativa ( $P > 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle (96%).

#### 2.4. VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES DE *Mus domesticus domesticus*

Lopes (1989) comparou os métodos ultra-rápido (10% GLY + 0,25M SAC e 20% GLY + 0,5M SAC) e vitrificação (10% GLY + 20% PG) para criopreservação de embriões de camundongos em diferentes estádios de desenvolvimento. Não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) nas taxas de sobrevivência (25 e 26%) dos dois tratamentos para embriões criopreservados no estágio de BI.

Ishimori *et al.* (1992a) vitrificaram BI de camundongos (ICR) em diferentes associações de crioprotetores. Cada solução foi composta por dois crioprotetores na concentração de 25% cada. Os embriões foram equilibrados por 5min em soluções diluídas em 50% de PBS (solução salina tamponada), transferidos para as soluções de vitrificação e imersos em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>L) após 30s. As taxas de sobrevivência foram: 72% (GLY + EG), 29% (GLY + PG), 55% (GLY + DMSO), 46% (EG + PG), 79% (EG + DMSO) e 46% (PG + DMSO).

Ishimori *et al.* (1992b) estudaram as condições ideais para vitrificação de BI de camundongos numa solução contendo 4,5M EG + 3,4M DMSO (VS1). Os BI equilibrados na solução VS1 diluída em 50% de PBS (60s), transferidos para a solução VS1 (30s) e, então, imersos em N<sub>2</sub>L, alcançaram 80% de sobrevivência embrionária.

Miyake *et al.* (1993) vitrificaram embriões de camundongos (ICR) em vários estádios de desenvolvimento numa solução de vitrificação EFS40, composta por 40% EG + 18% FICOLL + 0,3M SAC dissolvida em PBS. Os embriões vitrificados no estádio de BI, alcançaram taxas de sobrevivência de 79 e 49%, para 2 e 5min de exposição, respectivamente.

Zhu *et al.* (1993), após equilíbrio de Bx murinos (ICRxBDF1) em 10 e 20% EG em PBS à 20°C por 5min e vitrificação em EFS40 (40% EG + 30% FICOLL + 0,5M SAC) por 30s, observaram 83 e 84% de re-expansão,

respectivamente. Dos embriões vitrificados diretamente na solução EFS40, apenas 66% re-expandiram após 48h de cultivo.

Horlacher; Brem (1994) testaram a eficácia de três diferentes métodos 'two step' para a vitrificação de B1 murinos. Os embriões foram equilibrados por 10min em 10% GLY + 20% PPD (Propanodiol), 25% VS3 e 50% VS3D e então transferidos para as soluções de vitrificação 25% GLY + 25% PG por 30s, 100% VS3 (6,5M GLY) por 30s e 100% VS3D (25% EG + 25% DMSO) por 2min, respectivamente. As taxas de sobrevivência *in vitro* foram 45,8% (27/59), 55,8% (53/95) e 75,5% (40/53), respectivamente.

Cseh *et al.* (1997) vitrificaram embriões de *Mus domesticus domesticus* (CB6F1) cultivados a partir de 1-célula em meio HTF + 4mg/ml BSA por 96 a 120h numa solução de 3M EG + 0,25M SAC + 10% SFB. As taxas de sobrevivência foram significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) no grupo de mórulas e blastocistos jovens (Mo/Bj): 80% (56/70) em relação ao grupo de Bx/Be: 17% (10/59).

Vajta *et al.* (1997) modificaram a técnica de vitrificação de utilizando palhetas de 0,25ml (IMV) alongadas (OPS), tendo como consequência uma diminuição de volume. Os embriões foram equilibrados em 10% EG + 10% DMSO em meio de cultivo celular (TCM) + HEPES + 20% SFB por 60s, transferidos para solução de 20% EG + 20% DMSO + 0,6M SAC por 30s e envasados em mini-palhetas francesas pelo efeito capilaridade. Esta técnica

proporcionou melhores resultados na taxa de sobrevivência (95%) e na taxa de eclosão (92%) de BI bovinos produzidos *in vitro*, quando comparados com o método 'two step' tradicional com 79 e 59%, respectivamente.

Paixão Côrtes (1998) estudou a viabilidade *in vitro* de BI *Mus domesticus domesticus* vitrificados após exposição prévia por 2min em 1,8M EG + 6% BSA seguido de 30s em 9,0M EG + 6% BSA ou imersão direta em 9,0M EG + 6% BSA após 30s com ou sem 0,3M SAC com retirada do crioprotetor em PBS + 0,4% BSA com ou sem 1M SAC. As soluções que apresentaram maiores taxas de eclosão foram as soluções VSI (1,8M EG + 6% BSA seguida de 9,0M EG + 6% BSA) com 49% (19/39) e VSIS (9,0M EG + 6% BSA + 0,3M SAC) com 39% (20/51) ambos com retirada em PBS + 0,4% BSA.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. LOCAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre-RS, no período de março a novembro de 1998.

#### 3.2. MATERIAL

O material reutilizável utilizado nos experimentos foi lavado cuidadosamente em água corrente com sabão neutro (Extran-Merck), enxaguado em água destilada e deionizada sendo, então, submetido à secagem (forno Pasteur), embalagem e esterilização em calor seco (120°C) por 2h.

##### 3.2.1. Animais

Foram utilizados machos e fêmeas da espécie *Mus domesticus domesticus*, linhagens SWISS e CF-1, respectivamente, com idades variando entre 6 e 8 semanas, adquiridos no Instituto de Pesquisas Biológicas da Secretaria de Saúde e Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre-RS.

Os animais foram mantidos em biotério climatizado com iluminação controlada de 14h luz/dia (início 8:00h), ventilação constante, temperatura entre 18 e 22°C, água e ração (Nuvital) *ad libitum*, por um período mínimo de 14 dias de adaptação. Os machos foram mantidos em gaiolas individuais (Growing-Tríade) e as fêmeas divididas em grupos de, no máximo, 10 por gaiola de polipropileno (Mousepaç-Tríade).

Após o período de adaptação, as fêmeas foram submetidas ao tratamento superovulatório e acasaladas com machos inteiros para produção dos embriões. O controle reprodutivo dos machos foi realizado através do registro do número de placas vaginais positivas que cada macho proporcionou, numa planilha de controle, a cada acasalamento, oferecendo períodos de repouso sexual a intervalos regulares. As fêmeas que apresentaram placa vaginal após o acasalamento foram separadas para posterior colheita dos embriões. As fêmeas acasaladas que não apresentaram placa vaginal foram marcadas com uma solução de ácido pícrico a 1% na região lombar, separadas do grupo e submetidas a um novo tratamento superovulatório após 2 semanas. Fêmeas que falharam em dois tratamentos foram descartadas.

A limpeza do biotério foi realizada duas vezes por semana, procedendo-se a lavagem das gaiolas, substituição da cama de serragem, lavagem dos bebedouros e reposição de água e ração, limpeza das estantes e do filtro do condicionador de ar.

### 3.2.2. Hormônios

Foram utilizados os hormônios gonadotrofina coriônica eqüina-eCG (Folligon-Intervet) e gonadotrofina coriônica humana-hCG (Pregnyl-Organon) para a sincronização do ciclo estral e superovulação das camundongas. Os hormônios liofilizados foram diluídos em solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) na concentração de 50UI/ml. Após a diluição, as soluções foram fracionadas em alíquotas de 3ml e mantidas à -20°C. Previamente à sua utilização, as alíquotas foram descongeladas em banho-maria (25°C) ou à temperatura ambiente.

### 3.2.3. Meios de colheita e de cultivo

Para colheita dos embriões de 1-célula foi utilizada a solução salina fosfato tamponada (PBS) de Dulbecco; Vogt (1954), modificada por Whittingham (1971a). Os embriões de 1-célula foram cultivados em três diferentes meios: CZB, HTF e KSOM (Tab. 1).

Os sais foram pesados em balança analítica (Kem) e diluídos em água ultra-pura (MilliQ). O pH (Celm) e a osmolaridade (Precision Systems) dos meios de colheita e de cultivo foram aferidos, sendo ajustados para 7.10-7.20 e 270-290 mOsm/kg (Brinster, 1965), respectivamente. A solução de PBS foi alíquotada em frascos estéreis de 20ml e armazenados à -20°C. Previamente ao uso, a solução foi descongelada e à ela adicionados 20% de

soro fetal bovino inativado-SFBI (Nutricell). Em seguida, procedeu-se a esterilização em filtro com poros 0,22 $\mu$ m (Millipore). Os meios de cultivo foram preparados da mesma forma que a solução de PBS, sendo armazenados à 4°C por, no máximo, duas semanas.

TABELA 1. Composição (mM) dos meios de cultivo. Porto Alegre, 1999.

COMPONENTES	LABORATÓRIO	CZB	HTF	KSOM
NaCl	(SIGMA S-5886)	81,62	97,60	95,00
KCl	(SIGMA P-5405)	4,83	4,70	2,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(SIGMA P-5655)	1,18	0,01	0,35
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	-	1,18	0,20	0,20
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	(SIGMA C-7902)	1,70	2,04	1,71
NaHCO <sub>3</sub>	(SIGMA S-5761)	25,12	25,00	25,00
Piruvato de Na	(MERCK 6619)	0,27	0,33	0,20
Lactato de Na	(SIGMA L-1375)	31,30	21,40	10,00
Glicose	(SIGMA G-6152)	-	2,78	0,20
EDTA	(SIGMA E-6758)	0,11	0,10	0,01
Glutamina	(SIGMA G-5763)	1,00	1,00	1,00
Vermelho fenol	(SIGMA P-5530)	-	0,003	0,01
Penicilina G sódica	(SIGMA P-3032)	-	-	100
Sulfato Gentamicina	(SIGMA G-1264)	-	10	-
HEPES	(SIGMA H-3375)	-	20	25
Razão lactato/piruvato	-	116,0	64,8	50,0

#### 3.2.4. Soluções crioprotetoras

Para a vitrificação dos embriões foi utilizada uma solução de PBS acrescida de 6% de BSA com diferentes concentrações de EG (Reagen), de acordo com o tratamento proposto:

a) Solução de vitrificação 1 (VS1):

SCI = 1,8M EG em PBS + 6%BSA (por 60s)

SCE = 9,0M EG em PBS + 6%BSA (imersão direta)

b) Solução de vitrificação 2 (VS2):

9,0M EG + 0,3M SAC (Merck) em PBS + 6%BSA (imersão direta)

Os crioprotetores foram diluídos em PBS de acordo com a concentração final e transferidos para o interior de uma proveta contendo BSA (VS1) ou BSA + SAC (VS2). Em seguida, foram mantidos sob agitação até a completa dissolução, sendo então fracionados em frascos de 2ml e armazenados à -20°C até sua utilização.

A diluição dos crioprotetores foi realizada diretamente numa solução de PBS acrescida de 0,4% de BSA. As soluções de vitrificação e de retirada do crioprotetor foram preparadas nas mesmas condições e em quantidades suficientes para a realização de cada etapa do experimento.

### 3.3. MÉTODOS

#### 3.3.1. Fase 1

Foram realizados quatro experimentos nos quais buscou-se otimizar o cultivo de embriões de pré-implantação de forma a ultrapassar o bloqueio de 2-células. Pesquisou-se três meios de cultivo (CZB, HTF e KSOM) suplementados com diferentes fontes proteicas (SFB e BSA), com ou sem tampão iônico (HEPES) e com a retirada de glicose em diferentes períodos do cultivo (24 e 48h).

##### 3.3.1.1. Sincronização do ciclo estral e superovulação das doadoras

A sincronização do ciclo estral e superovulação das fêmeas CF1 foi realizada mediante a aplicação intraperitoneal de 0,2ml contendo 10UI de eCG às 15:00h e, 46h após, de 0,2ml contendo 10UI de hCG. Imediatamente após a segunda injeção, as fêmeas foram colocadas com machos SWISS de fertilidade comprovada, na proporção de 2 fêmeas por macho. A cópula foi confirmada pela presença do tampão vaginal 17-19h após a injeção de hCG.

### 3.3.1.2. Colheita e classificação morfológica

As fêmeas doadoras foram sacrificadas por deslocamento cervical 28-30h pós-hCG e colocadas em decúbito dorsal sobre uma cerâmica 15x15cm. Procedeu-se a abertura da cavidade abdominal através de uma incisão transversal de aproximadamente 1cm, próxima ao par de mamilos inguiniais. Os ovidutos foram removidos através de incisões com tesoura abrangendo a região de contigüidade entre os ovários e a parte cranial dos cornos uterinos. Em seguida, os ovidutos foram agrupados, dois a dois, em gotas do meio de colheita dispostas em placas de Petri de 90mm (Costar) com temperatura controlada (37°C).

Os embriões de 1-célula foram colhidos com o auxílio de uma pinça oftálmica e uma seringa de 1ml com agulha hipodérmica descartável 30G (B&D) de ponta romba que perfundiu os ovidutos com 0,2ml de PBS + 20%SFB através do infundíbulo. O procedimento foi realizado sob lupa estereomicroscópica (Meiji) com luz incidente e com magnitude de 10 vezes. Para busca e avaliação das estruturas embrionárias, utilizou-se magnitude de 40 vezes. Quando necessário, as células do *Cumulus oophorus* foram removidas por meio de uma breve exposição (20s) a 300UI/ml de hialuronidase (Sigma) em meio PBS+ 20%SFB.

As estruturas localizadas foram recolhidas com o auxílio de uma micropipeta de vidro adaptada a um aspirador de controle bucal e

transferidas para novas gotas de PBS + 20%SFB. Após uma prévia seleção, os embriões de 1-célula foram lavados 5 vezes em PBS + 20%SFB e mais 3 vezes na solução que seria posteriormente utilizada para o cultivo *in vitro*. Todas as soluções, placas e instrumentos do procedimento foram mantidos à temperatura de 37°C.

A classificação morfológica quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade dos embriões obedeceu as normas estabelecidas no manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (Stringfellow; Seidel, 1998).

#### 3.3.1.3. Cultivo *in vitro* dos embriões

Foram cultivados 3628 embriões de 1-célula, divididos em 4 experimentos (meio de cultivo, fonte proteica, tampão iônico e ausência de glicose), num total de 20 replicações. Em todas as rotinas, os embriões foram cultivados por 120h em grupos de 20 em gotas de 50µl de meio de cultivo (conforme a rotina), sob óleo mineral (Sigma) em placas de Petri de 35mm (Costar), para avaliação da taxa de eclosão. Para corrigir a variação de desenvolvimento entre as fêmeas, as estruturas viáveis de cada doadora foram distribuídas aleatoriamente entre os tratamentos. Todas as placas foram equilibradas em estufa de cultivo (Forma Scientifica) por um período mínimo de 2h antes do cultivo. O cultivo foi realizado à 37°C sob atmosfera de 5%CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa do ar.

### 3.3.2. Fase 2

#### 3.3.2.1. Cultivo *in vitro* dos embriões

No experimento 1 foram cultivados 755 embriões de 1-célula por 120h, para se avaliar o efeito de diferentes meios sobre a taxa de eclosão. Os embriões foram divididos em 2 grupos: HTF e KSOM suplementados com 4mg/ml de BSA e 20 e 25mM de HEPES, respectivamente, e cultivados nas condições anteriormente descritas.

#### 3.3.2.2. Viabilidade após exposição às soluções crioprotetoras

No experimento 2 determinou-se a taxa de eclosão de 152 BI, produzidos a partir de embriões de 1-célula cultivados em meio KSOM suplementado com 4mg/ml de BSA e 25mM de HEPES até os estádios de blastocisto inicial e blastocisto, após a exposição às soluções de vitrificação (VS1 e VS2). Somente as estruturas classificadas morfológicamente como excelentes (grau 1) foram expostas às soluções crioprotetoras pelo período de tempo pré-determinado para a vitrificação (item 3.2.4) e, em seguida, transferidas para a solução de retirada do crioprotetor. Após a retirada do crioprotetor, os embriões foram lavados em 3 banhos sucessivos de PBS + 0,4% de BSA e mais 5 banhos sucessivos em meio KSOM. Os embriões foram colocados novamente em cultivo, nas mesmas gotas em que já

havia sido cultivados anteriormente. A avaliação da viabilidade embrionária foi determinada pela taxa de eclosão dos embriões após 48h de cultivo.

### 3.3.2.3. Viabilidade após vitrificação

No experimento 3 avaliou-se a viabilidade embrionária de 140 BI (grau 1), provenientes do cultivo *in vitro* de embriões de 1-célula em meio KSOM, submetidos ao processo de vitrificação. As soluções crioprotetoras foram descongeladas e mantidas à mesma temperatura de cultivo (37°C) até o momento de sua utilização. Os embriões selecionados do cultivo receberam 3 banhos sucessivos em PBS + 20%SFB antes de serem transferidos para as soluções crioprotetoras, não ultrapassando um período superior a 30 minutos. Para incrementar o processo de vitrificação foram feitas algumas alterações no preparo das palhetas, a partir da técnica descrita por Vajta *et al.* (1997). Palhetas francesas de 0,25ml (IMV) foram aquecidas sobre uma placa aquecedora e, manualmente esticadas até que o diâmetro interior e a espessura da parede central diminuíssem aproximadamente de 1,7mm para 0,8mm e de 0,15mm para 0,07mm, respectivamente. Em seguida, as palhetas foram resfriadas ao ar e cortadas na ponta aberta com uma gilete. A colocação dos embriões no interior das palhetas foi realizada com o auxílio de uma micropipeta de vidro adaptada a um aspirador de controle bucal.

No tratamento VS1, grupos de 10 embriões foram expostos por 2 minutos à solução de criopreservação intracelular-SCI (1,8M EG em PBS +

6%BSA), em seguida pipetados e transferidos para o interior de palhetas francesas de 0,25ml modificadas (OPSm) contendo a solução de criopreservação extracelular-SCE (9,0M EG em PBS + 6%BSA), as quais foram imediatamente imersas em N<sub>2</sub>L.

No tratamento VS2, grupos de 10 embriões foram pipetados e transferidos para o interior de palhetas francesas de 0,25ml modificadas (OPSm) contendo solução de vitrificação (9,0M EG + 0,3M SAC em PBS + 6%BSA), sendo imediatamente imersas em N<sub>2</sub>L. Ao serem retiradas do botijão de N<sub>2</sub>L, foram expostas ao ar por 10s e, em seguida, imersas em banho-maria a 20°C por mais 20s. Após a secagem em papel toalha, o seu conteúdo foi colocado numa placa de Petri de 35mm (Costar) contendo 2,0ml de uma solução de PBS + 0,4% de BSA. Em seguida, os embriões foram lavados em 3 banhos de PBS + 0,4% de BSA e mais 5 banhos sucessivos em meio KSOM. A avaliação da viabilidade embrionária foi determinada pela taxa de eclosão dos embriões após 48h de cultivo.

### 3.3.3. Metodologia estatística

Nos experimentos de cultivo foi realizado o Teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), com a finalidade de comparar a taxa de desenvolvimento nos diferentes estádios entre os tratamentos. A análise foi dividida de acordo com o estágio de

desenvolvimento embrionário: 4 células (4c), Mo, Bl, Bx e Be, e com o meio de cultivo utilizado.

Nos experimentos de exposição e vitrificação dos embriões às soluções crioprotetoras, determinou-se a sobrevivência embrionária através do número de eclosões em cada tratamento. Em ambos foi utilizada a mesma metodologia estatística empregada nos experimentos de cultivo. A existência de significância no teste  $\chi^2$  determinou a necessidade de análise dos resíduos ajustados, através do qual foi possível comprovar quais os tratamentos foram estatisticamente diferentes entre si para um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. FASE 1

#### 4.1.1. Meios de cultivo

Na avaliação do desenvolvimento de embriões de 1-célula, registrou-se diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em favor do meio KSOM (Tab. 2), embora tenha ocorrido 100% de bloqueio à nível de embriões de 2-células.

TABELA 2. Desenvolvimento de embriões de 1-célula de *Mus domesticus domesticus* nos meios CZB, HTF e KSOM suplementados com 20% de SFB. Porto Alegre, 1999.

MEIOS	1c		2c		BI	
	n <sup>1</sup>	n	%	n	%	
CZB	307	139 <sup>b</sup>	45,3	0	0,0	
HTF	345	202 <sup>b</sup>	58,5	0	0,0	
KSOM	254	187 <sup>a</sup>	73,6	0	0,0	

<sup>1</sup> Dados de 6 replicações.

<sup>a,b</sup> Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.2. Fontes proteicas

Os efeitos da suplementação do meio KSOM com 20% de SFB ou 4mg/ml de BSA em cultivo por 120h (Tab. 3) mostraram não haver diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos para a taxa de clivagem até 2-células. Entretanto, a adição de BSA ao meio KSOM permitiu a continuidade do

desenvolvimento embrionário *in vitro*, alcançando uma taxa de eclosão de 13,5%, ao contrário do meio suplementado com SFB, no qual observou-se o bloqueio de 2-células.

TABELA 3. Desenvolvimento de embriões de 1-célula de *Mus domesticus domesticus* no meio KSOM suplementado com 20% de SFB ou 4mg/ml de BSA. Porto Alegre, 1999.

MEIOS	1c		2c		BI		Bx		Be	
	n <sup>1</sup>	n	%	n	%	n	%	n	%	
KSOM + SFB	142	113 <sup>a</sup>	79,6	0	0,0	-	-	-	-	
KSOM + BSA	141	118 <sup>a</sup>	83,0	58	41,1	38	26,9	19	13,5	

<sup>1</sup> Dados de 2 replicações.

<sup>a</sup> Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística (P>0,05).

#### 4.1.3. Tampão iônico

A adição de 20 e 25mM de HEPES aos meios HTF e KSOM, respectivamente, proporcionou um aumento no número de BI, em relação ao meio KSOM sem HEPES (Tab. 3) e, além disto, um acréscimo uniforme no desenvolvimento até a eclosão, para ambos os meios (Tab. 4).

TABELA 4. Desenvolvimento de embriões de 1-célula de *Mus domesticus domesticus* nos meios HTF e KSOM suplementados com BSA e 20 e 25mM de HEPES, respectivamente. Porto Alegre, 1999.

MEIOS	1c		2c		Bl		Bx		Be	
	n <sup>1</sup>	n	%	n	%	n	%	n	%	
HTF	146	123 <sup>a</sup>	84,2	88 <sup>a</sup>	60,3	86 <sup>a</sup>	58,9	82 <sup>a</sup>	56,2	
KSOM	159	135 <sup>a</sup>	84,9	95 <sup>a</sup>	59,7	94 <sup>a</sup>	59,1	93 <sup>a</sup>	58,5	

<sup>1</sup> Dados de 2 replicações.

<sup>a</sup> Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística (P>0,05).

#### 4.1.4. Influência da glicose

Para concluir a fase 1, avaliaram-se os meios HTF e KSOM suplementados com BSA e HEPES, com diferentes períodos de retirada da GLI (24 e 48h) a partir do início do cultivo dos embriões de 1-célula (Tab. 5 e 6).

TABELA 5. Desenvolvimento de embriões de 1-célula de *Mus domesticus domesticus* nos meios HTF e KSOM suplementados com BSA e HEPES com presença da glicose a partir de 24h do início do cultivo. Porto Alegre, 1999.

GRUPOS	1c		4c		Bl		Bx		Be	
	n <sup>1</sup>	n	%	n	%	n	%	n	%	
HTF	197	159 <sup>a</sup>	80,7	101 <sup>b</sup>	51,2	90 <sup>b</sup>	45,7	79 <sup>b</sup>	40,1	
KSOM	227	187 <sup>a</sup>	82,4	156 <sup>a</sup>	68,7	147 <sup>a</sup>	64,7	134 <sup>a</sup>	59,0	

<sup>1</sup> Dados de 2 replicações.

<sup>a,b</sup> Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa (P<0,05).

TABELA 6. Desenvolvimento de embriões de 1-célula de *Mus domesticus domesticus* nos meios HTF e KSOM suplementados com BSA e HEPES com presença da glicose a partir de 48h do início do cultivo. Porto Alegre, 1999.

Grupos	1c		4c		BI		Bx		Be	
	n <sup>1</sup>	n	%	n	%	n	%	n	%	
HTF	488	428 <sup>a</sup>	87.7	328 <sup>a</sup>	67.7	319 <sup>a</sup>	65.3	248 <sup>a</sup>	50.8	
KSOM	458	400 <sup>a</sup>	87,3	332 <sup>a</sup>	72,5	314 <sup>a</sup>	68,5	233 <sup>a</sup>	50,8	

<sup>1</sup> Dados de 3 replicações.

<sup>a</sup> Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística (P>0,05).

## 4.2. FASE 2

### 4.2.1. Cultivo *in vitro* dos embriões

O experimento 1 foi realizado após a seleção dos meios de cultivo (HTF e KSOM), da fonte proteica (4mg/ml de BSA), do uso do tampão iônico (20 e 25mM de HEPES) e da glicose. Neste experimento foram cultivados 755 embriões de 1-célula, divididos em 2 grupos: HTF e KSOM, nas condições acima mencionadas, por 120h até a eclosão (Tab. 7).

TABELA 7. Desenvolvimento de embriões de 1-célula de *Mus domesticus domesticus* nos meios HTF e KSOM suplementados com 20 e 25mM de HEPES, respectivamente. Porto Alegre, 1999.

MEIOS	1c		4c		Bl		Bx		Be	
	n <sup>1</sup>	n	%	n	%	n	%	n	%	
HTF	332	290 <sup>a</sup>	87,3	247 <sup>a</sup>	74,4	242 <sup>a</sup>	72,9	176 <sup>a</sup>	53,0	
KSOM	423	375 <sup>a</sup>	88,6	304 <sup>a</sup>	71,8	294 <sup>a</sup>	69,5	261 <sup>a</sup>	61,7	

<sup>1</sup> Dados de 2 replicações.

<sup>a</sup> Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística (P>0,05).

#### 4.2.2. Viabilidade após exposição às soluções crioprotetoras

No experimento 2 avaliou-se a taxa de sobrevivência embrionária de 152 Bl (grau 1) de *Mus domesticus domesticus* expostos às soluções crioprotetoras. Após a passagem pelas soluções VS1 e VS2, os embriões foram colocados novamente em cultivo, por mais 48h, e então avaliados pelo número de eclosões (Tab. 8).

TABELA 8. Viabilidade embrionária *in vitro* após exposição às soluções de vitrificação de blastocistos de *Mus domesticus domesticus* cultivados a partir de embriões de 1-célula no meio KSOM. Porto Alegre, 1999.

Tratamentos	Expostos		Eclodidos	
	n <sup>1</sup>	n	n	%
VS I	51	42 <sup>a</sup>		82,3
VSII	51	40 <sup>a</sup>		78,4
Controle	50	43 <sup>a</sup>		86,0

<sup>1</sup> Dados de 1 replicação.

<sup>a</sup> Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística (P>0,05).

#### 4.2.3. Viabilidade após vitrificação

No experimento 3 avaliou-se a viabilidade embrionária *in vitro* de 140 BI (grau 1) de *Mus domesticus domesticus* através da taxa de eclosão após a criopreservação e cultivo por 48h. Após a desvitrificação, foi realizada a retirada do crioprotetor diretamente em solução de PBS + 0,4% de BSA (Tab. 9).

TABELA 9. Viabilidade embrionária *in vitro* após vitrificação de blastocistos de *Mus domesticus domesticus* cultivados a partir de embriões de 1-célula no meio KSOM. Porto Alegre, 1999.

Tratamentos	Vitrificados		Eclodidos	
	n <sup>1</sup>	n	%	
VS I	70	32 <sup>a</sup>	45,7	
VSII	70	28 <sup>a</sup>	41,4	

<sup>1</sup> Dados de 1 replicação.

<sup>a</sup> Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística (P>0,05).

## 5. DISCUSSÃO

Embora o primeiro meio elaborado para o cultivo *in vitro* de embriões de mamíferos, KRB + BSA em 5% CO<sub>2</sub>, tenha sido descrito por Whitten (1956), aparentemente foi Hammond, em 1949, quem deu início à esta biotécnica cultivando embriões de camundongos de 8-células até BI em solução salina acrescida de gema de ovo. Ainda, de valor histórico foram as pesquisas de Biggers; McLaren (1958) que obtiveram os primeiros fetos nascidos a partir de BI de camundongos despigmentados, cultivados *in vitro* desde o estágio de 8-células e transferidos para receptoras pigmentadas.

Na década seguinte, introduziu-se o piruvato e o lactato ao meio BMOC-2 (Brinster, 1965; 1967) e surgiram os primeiros estudos com embriões de humanos fertilizados *in vitro* e cultivados em meios semi-definidos suplementados com SFB ou BSA (Edwards *et al.*, 1969; 1970).

A partir daí, inúmeras pesquisas proporcionaram grande avanço na formulação dos meios de cultivo, como a elaboração do meio HTF com base na composição do fluido do oviduto humano (Quinn *et al.*, 1985) e as modificações no meio BMOC-2, que passou a ser denominado CZB, segundo Chatot *et al.* (1989).

Estudos desenvolvidos no início da década de 90 promoveram importantes modificações nos meios de cultivo, que proporcionaram o

completo desenvolvimento embrionário *in vitro* em algumas espécies (Gardner; Leese, 1990).

Nos anos seguintes, intensificadas as pesquisas e tendo o *Mus domesticus domesticus* como modelo experimental, registrou-se o cultivo bem sucedido a partir de embriões de 1-célula atingindo taxas de BI de 48% (Chatot *et al.*, 1989) e 71% (Chatot *et al.*, 1990) em meio CZB, de 88% (Erbach *et al.*, 1994) e 90% (Summers *et al.*, 1995) em meio KSOM e de 92% (O'Neill, 1997) em meio HTF. Levando em consideração estas informações foram desenvolvidos os pré-experimentos da presente pesquisa. Do mesmo modo, a escolha dos animais (CF1xSWISS) baseou-se nos estudos sobre linhagens de camundongos que apresentam (heterogênicas) ou não (isogênicas) o bloqueio de desenvolvimento *in vitro* (Whitten; Biggers, 1968; Whittingham, 1971a; Muggleton-Harris *et al.*, 1982 e Goddard; Pratt, 1983).

Na fase 1, os embriões de 1-célula de linhagens heterogênicas cultivados no meios CZB, HTF e KSOM suplementados com 20% de SFB não se desenvolveram além do estágio de 2-células, corroborando os achados de Whitten; Biggers (1968) e Whittingham (1971a).

A interrupção do desenvolvimento embrionário foi devido, provavelmente, ao fenômeno designado como bloqueio de 2-células, o qual ocorre no cultivo *in vitro* de embriões de algumas linhagens de

camundongos (Whitten; Biggers, 1968). Diante destas observações passou-se a considerar a influência de um componente genético (Whittingham, 1971a) para o sucesso do cultivo *in vitro*.

Na opinião de Bensaude *et al.* (1983), o bloqueio de desenvolvimento se deve à interrupção da maioria dos processos de transcrição logo após a primeira clivagem, caracterizados pela degradação do RNAm materno e ativação do genoma embrionário no final do estágio de 2-células, tendo como consequência alterações drásticas na síntese de proteínas. Igualmente, Brinster (1967) afirmou que há um decréscimo do conteúdo total das proteínas embrionárias durante os primeiros 3 dias de desenvolvimento na ordem de 25%.

Utilizando cruzamentos recíprocos entre linhagens heterogênicas e isogênicas, Goddard; Pratt (1983) demonstraram que o bloqueio de 2-células no cultivo *in vitro* é um fenômeno de regulação materna. Transferindo o citoplasma de embriões de linhagens isogênicas para embriões de linhagens heterogênicas, Muggleton-Harris *et al.* (1982) e Pratt; Muggleton-Harris (1988) demonstraram que o bloqueio é mediado por um componente citoplasmático do oócito (materno), o qual pode estar ausente em embriões de linhagens heterogênicas.

Para Telford *et al.* (1990), o bloqueio parece coincidir com o momento da ativação do genoma embrionário, o qual pode ocorrer em diferentes estádios de desenvolvimento nas diversas espécies.

Por outro lado, Bavister (1995) apresentou uma série de razões contestando estas afirmações: 1) a ativação do genoma embrionário ocorre progressivamente durante o período de pré-implantação, sendo improvável que o bloqueio ocorra em determinado estágio de desenvolvimento; 2) a ocorrência do bloqueio em várias espécies coincide com o momento de transição dos estádios de desenvolvimento do oviduto para o útero; 3) a produção inadequada de energia devido à composição inadequada de nutrientes ou de substratos energéticos do meio de cultivo e ainda, 4) a produção de componentes tóxicos e radicais livres que podem causar danos às membranas celulares, elevar o pH intracelular e/ou alterar a função mitocondrial.

Embora tenha ocorrido 100% de bloqueio no presente experimento, registrou-se um índice de clivagem até 2-células no meio KSOM significativamente superior ( $P < 0,05$ ) ao que foi observado nos meios CZB e HTF (Tab. 2).

No experimento para se avaliar as fontes proteicas, o meio KSOM suplementado com 20% SFB ou 4mg/ml BSA (Tab. 3) proporcionou taxas de clivagem até 2-células semelhantes ( $P > 0,05$ ), sendo este o limite de

desenvolvimento para os embriões cultivados em meio KSOM + SFB. Por outro lado, 83% dos embriões cultivados em KSOM + BSA ultrapassaram o bloqueio, dos quais 41,1% chegaram a BI e 13,5% a Be.

Estes resultados são inferiores aos obtidos por Erbach *et al.* (1994) e Summers *et al.* (1995), que conseguiram 88,1 e 90% de BI cultivando embriões a partir de 1-célula (CF1) em meio KSOM + BSA.

Portanto, a comparação entre os resultados das tabelas 2 e 3, torna evidente que a adição de 4mg/ml de BSA ao meio KSOM não somente melhorou o índice de clivagem inicial, como permitiu a continuidade do desenvolvimento embrionário *in vitro*. Concordando com estes achados, Fitzgerald; Di Mattina (1992) observaram que a adição de soro aos meios CZB e Earle's para o cultivo *in vitro* de embriões de humanos provocou uma diminuição na taxa de sobrevivência embrionária. Na opinião de Maurer (1992), o soro pode fornecer elementos benéficos ao meio de cultura como substratos energéticos, aminoácidos, vitaminas e fatores de crescimento, mas pode ser também altamente tóxico para o embrião, devido às alterações químicas decorrentes do processo de coagulação sangüínea.

Contrariando estas observações, Caro; Trounson (1984) relataram não haver diferença no cultivo *in vitro* de embriões de murinos, usando SFB, BSA ou nenhuma proteína no meio de cultivo.

A utilização de BSA nos meios de cultivo pode estimular ou inibir a proliferação e o crescimento celular de acordo com a pureza química e a sua concentração (Thomassen, 1989). Em um estudo anterior, embriões de murinos ultrapassaram o bloqueio com o aumento na concentração de BSA, de 1 para 4mg/ml (Whittingham, 1969), dosagem esta também empregada neste estudo e que possibilitou a continuidade do desenvolvimento embrionário.

Como forma de evitar os efeitos deletérios de contaminantes, incluindo ácidos graxos livres, Bavister (1995) recomendou o uso de BSA 'fração V' com 96 a 99% de pureza. O efeito benéfico de proteínas, tal como a BSA, é que elas podem ser consumidas pelo embriões via endocitose e, os aminoácidos formados vão participar de processos metabólicos e anabólicos (Brinster, 1965; Whittingham, 1971a).

A adição do tampão iônico HEPES aos meios HTF e KSOM registrou um incremento considerável e mais uniforme em todas as fases do desenvolvimento pré-implantação (Tab. 4), proporcionando taxas de crescimento embrionário semelhantes ( $P>0,05$ ) de BI (60,3 e 59,7%) e de Be (56,2 e 58,5%), respectivamente.

O mesmo observaram Wütke; Walz (1990) e Montagner *et al.* (1998), onde a adição do HEPES proporcionou melhor equilíbrio iônico aos meios de cultivo, sendo que estes últimos autores ressaltam que mesmo incubadoras

de alta precisão estão sujeitas às variações de pH devido as manipulações e quedas de energia. Corroborando estas observações, Brinster (1965) e Lawitts; Biggers (1991) afirmaram que a presença do tamponante HEPES mantém o pH entre 7,10 e 7,20 e a osmolaridade entre 270 e 290mOsm/Kg.

O último experimento da fase 1 avaliou a capacidade de adaptação *in vitro* de embriões de 1-célula expostos a diferentes períodos de cultivo sem GLI (Tab. 5 e 6). Os embriões cultivados em meio HTF e KSOM com GLI após 24h do início do cultivo (2-células) não apresentaram diferença significativa ( $P>0,05$ ) nas taxas de desenvolvimento até o estágio de 4-células, porém a partir do estágio de B1 o meio HTF apresentou decréscimo acentuado em relação ao meio KSOM (Tab. 5) na capacidade de promover o desenvolvimento embrionário.

A alta concentração de GLI no meio HTF (2,78mM), 14 vezes superior à concentração no meio KSOM (0,20mM), presente no período entre 2 e 4-células, provavelmente foi a responsável por menores taxas ( $P<0,05$ ) de B1 até Be (Tab. 5). Quando os embriões foram cultivados e transferidos para os meios HTF e KSOM com GLI após 48h do início do cultivo (4-células), a uniformidade nos índices de clivagens de ambos os meios ( $P>0,05$ ) tornou-se marcante (Tab. 6). A presente comprovação do efeito bifásico da GLI no cultivo de embriões de camundongos, inibitória nas primeiras 48h de cultivo e fundamental após a fase de compactação veio confirmar as afirmações de

Chatot *et al.* (1989, 1990); Lawjts; Biggers (1991) e Brown; Whittingham (1992).

Hsieh *et al.* (1979) e Chi *et al.* (1988), pesquisando o perfil enzimático de embriões de murinos pré-implantação, demonstraram que embriões de 1 e 2-células acumulam glicogênio, para que haja uma liberação progressiva e a GLI seja utilizada como fonte energética primária após a compactação. Posteriormente, Leppens-Luisier; Sakkas (1997) concluíram que durante o período de pré-implantação a GLI é utilizada em diferentes estádios por diferentes vias, podendo ser armazenada como glicogênio e destinada ao ciclo de Krebs ou então, consumida na via glicolítica, dependendo da atividade enzimática presente.

Conaghan *et al.* (1993), mensurando o consumo de diferentes substratos em meio de Earle's, também observaram efeito inibitório da GLI sobre o desenvolvimento de embriões de humanos somente nos estádios iniciais de desenvolvimento, sendo fundamental a partir do estágio de 8-células. O consumo da GLI foi mínimo (8pmol/embrião/h) nas primeiras 48h, aumentando significativamente ( $P < 0,001$ ) a partir dos dias 4-5 (20pmol/embrião/h) e 5-6 (34pmol/embrião/h) do início do cultivo. Os autores afirmaram ser peculiar e contraditória a escolha do momento ideal para se adicionar a GLI ao cultivo. Para Chatot *et al.* (1989), melhores resultados foram obtidos quando adicionaram a GLI após o bloqueio de 2-células e a ativação do genoma embrionário em camundongos (entre 2 e 4-células). Já

Fitzgerald; Di Mattina (1992) adicionaram a GLI no estágio de 4-células, ou seja, no momento ou logo após o bloqueio e ativação do genoma embrionário humano.

As taxas de BI produzidas em KSOM (72,5%) e HTF (67,7%) no presente ensaio foram superiores aos 60,0% de BI obtidos por Gardner; Leese (1990) e inferiores aos 80% alcançados por Ho *et al.* (1995) no cultivo contínuo de embriões de 1-célula de diversas linhagens heterogênicas. Ainda, foram inferiores aos resultados de Erbach *et al.* (1994) e Summers *et al.* (1995), com 88,0 e 96,9-100,0% de BI, respectivamente, obtidos a partir de embriões de 1-célula cultivados em meio KSOM suplementado com GLI em todo o cultivo. Provavelmente, os baixos resultados obtidos com a retirada da GLI por 24 (Tab. 5) ou 48h (Tab. 6) do início do cultivo em relação ao cultivo contínuo foram devidos à sua interação com outros componentes (aminoácidos, lactato, piruvato, GLU), ou então à efeitos decorrentes da manipulação dos embriões.

Apesar das várias pesquisas desenvolvidas até o momento, o mecanismo pelo qual a GLI exerce efeito inibitório sobre o desenvolvimento de embriões de mamíferos *in vitro* ainda não está bem claro.

Schini; Bavister (1988) e Seshagiri; Bavister (1991), estudando o bloqueio de desenvolvimento *in vitro* em embriões de hamster, propuseram que a GLI, provavelmente, inibe a atividade do Ciclo de Krebs através de um

fenômeno conhecido como 'Efeito Crabtree' (Crabtree, 1929), no qual a GLI induz à uma maior atividade glicolítica, esgotando as reservas de ATP (Adenosina tri-fosfato) necessárias à respiração e fosforilação oxidativa, com conseqüente inibição do desenvolvimento embrionário. Segundo os mesmos autores, a presença simultânea de GLI e fosfato intracelular ( $P_i$ ) pode estimular a glicólise em três níveis: enquanto a GLI é o substrato da glicólise, o  $P_i$  estimula a produção das enzimas glicolíticas (hexoquinase, fosfofrutoquinase e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e também é utilizado nas reações de fosforilação. O efeito em rede direciona o  $P_i$  para a glicólise com conseqüente desorganização do metabolismo mitocondrial. Isto poderia resultar em baixa produção de ATP, levando à diminuição ou ao bloqueio de desenvolvimento embrionário. Na ausência de GLI, o  $P_i$  poderia estimular a quebra do glicogênio armazenado, formando GLI-6P. Novamente, o estímulo da glicólise e o desvio do  $P_i$  resultariam numa insuficiente produção de ATP e inibição do desenvolvimento embrionário. Entretanto, na ausência de fosfato exógeno ( $P_e$ ), a via glicolítica provavelmente não é estimulada (Anexo - Fig. 1).

Assim como Erbach *et al.* (1994); Summers *et al.* (1995) e Leppens-Luisier; Sakkas (1997), que compararam o uso do meio KSOM com outros meios, no presente estudo observou-se que a GLI não é inibitória ao desenvolvimento do embrião 1-célula de camundongo até Be na presença de baixas concentrações de fosfato, tanto no meio KSOM (0,35mM), quanto no meio HTF (0,01mM).

Para que estas explicações possam se tornar realmente consistentes há necessidade de se conduzir experimentos com mensuração da respiração (teste respirométrico) dos embriões cultivados em condições idênticas às aquelas anteriormente descritas (Schini; Bavister, 1988).

No experimento de cultivo *in vitro* de embriões, na fase 2, os embriões cultivados em meio HTF e KSOM suplementados com BSA, HEPES e GLI em todo o cultivo (Tab. 7) apresentaram desenvolvimento superior aos experimentos anteriores. Em nenhuma das fases do crescimento embrionário observou-se diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os meios, sendo o aumento do número de células homogêneo até a eclosão. O meio HTF apresentou uma ligeira superioridade em promover o desenvolvimento até o estágio de Bx (72,9% versus 69,5%), porém o meio KSOM proporcionou maior número de Be (61,7% versus 53,0%) ao final de 120h de cultivo.

É importante salientar que além da participação de um componente genético (Whittingham, 1971a; Muggleton-Harris *et al.*, 1982; Goddard; Pratt, 1983; Pratt; Muggleton-Harris, 1988), a habilidade dos embriões de 1-célula de se desenvolverem *in vitro* sofre a ação de outros fatores, como componentes dos meios (Whittingham, 1969; Caro; Trounson, 1984; Zigler *et al.*, 1985; Maurer, 1992; Montagner *et al.*, 1998) e condições de cultivo (Whittingham, 1971a; Hogan *et al.*, 1986; Van Winkle *et al.*, 1990; Lawitts;

Biggers, 1991; Biggers *et al.*, 1993; Bavister, 1995; Hafez, 1995; Dawson; Baltz, 1997).

Por representar mais de 98% dos componentes dos meios de cultivo, a qualidade da água é extremamente importante. Na presente pesquisa utilizou-se água purificada por filtração (Sistema MilliQ), tendo em vista as observações de Whittingham (1971a), Hafez (1995) e Hogan *et al.* (1986). Do mesmo modo, tomou-se o cuidado de adicionar EDTA aos meios, evitando que o armazenamento por tempo prolongado pudesse causar contaminação por possíveis metais pesados (Abramczuk *et al.*, 1977).

Como preconizou Whittingham (1971a), no intuito de fornecer aos embriões condições semelhantes àsquelas encontradas no oviduto e lúmen uterino, as estufas foram supridas com concentração de 5% CO<sub>2</sub>. Altos níveis de CO<sub>2</sub> inibem a ação da enzima fosfofrutoquinase, determinando o bloqueio da glicólise em embriões pré-compactados *in vitro* (Bavister, 1988). Outros trabalhos sobre o metabolismo embrionário também observaram que a redução da concentração de CO<sub>2</sub> para níveis entre 5 e 7% aumentam significativamente a taxa de blastocistos (Chatot *et al.*, 1990).

Por outro lado, conforme Chatot *et al.* (1989); Lawitts; Biggers (1991); Biggers *et al.* (1993) e Dawson; Baltz (1997), a osmolaridade dos meios deve ser corrigida para valores entre 270 e 290mOsm/kg para permitir o desenvolvimento *in vitro* de embriões de 1-célula até B1, embora no fluido

normal do oviduto de camundongas prenhes ela esteja próxima de 360mOsm/kg.

Desta forma, o sucesso do cultivo *in vitro* de embriões de *Mus domesticus domesticus* a partir do estágio de 1-célula até Be, registrado neste experimento, aparentemente foi devido à otimização das condições de cultivo e dos meios utilizados, alcançada durante a fase 1.

As taxas de eclosão dos BI expostos às soluções crioprotetoras VS1 e VS2 (Tab. 8) não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si e com o grupo controle ( $P>0,05$ ), atingindo percentuais de 82,3; 78,4 e 86% de eclosão, respectivamente.

Estes valores estão muito próximos daquele relatado por Ishimori *et al.* (1992b) que expuseram BI murinos por 2min à uma solução composta (4,5M EG + 3,4M DMSO) e obtiveram 79% de Be. Contudo, são inferiores aos resultados de Valdez *et al.* (1992), com taxas de sobrevivência de 95,4 e 96,2% para os métodos 'one' e 'two step' ( $P>0,05$ ), respectivamente, e de Zhu *et al.* (1993) com as soluções EFS20, EFS30 e EFS40, com 100, 100 e 90% de sobrevivência.

A menor toxicidade do EG em relação á outros crioprotetores (DMSO, GLY e PG), devido ao seu baixo peso molecular, permite uma maior permeabilidade para o interior da célula durante um menor período de

exposição, com conseqüente rápido efluxo das células após aquecimento, prevenindo as injúrias de origem tóxica e osmótica. Quando o tempo de exposição de embriões de mamíferos às soluções de vitrificação foi superior a 2min provocou uma redução brusca na sobrevivência embrionária, conforme estudos de Ishimori *et al.* (1992b) e Zhu *et al.* (1993) em murinos.

As características de permeabilidade dos embriões são específicas para cada crioprotetor, determinando a dependência do tempo para que se estabeleça a relação entre a concentração intracelular do crioprotetor e a capacidade em promover a proteção contra os danos da criopreservação. Para Ishimori *et al.* (1992b), a toxicidade produzida por altas concentrações de crioprotetores pode ser evitada de diversas formas: menor tempo de exposição, redução da temperatura, inclusão de aditivos crioprotetores ou equilíbrio em duas ou mais etapas. Corroborando estas afirmações, Cseh *et al.* (1998) observaram que uma baixa concentração de EG (3,0M EG + 0,25M SAC + 10% SFB) permitiu o aumento do tempo de exposição para 20min, sem apresentar efeito tóxico, proporcionando resultados similares ( $P>0,05$ ) nos grupos tratamento (93%) e controle (98%).

Da mesma forma que Valdez *et al.* (1992), observou-se no presente experimento que o equilíbrio em 'two step' (VS1) proporcionou uma taxa de sobrevivência embrionária levemente superior ao equilíbrio em 'one step' (VS2), apesar de não apresentar diferença significativa ( $P>0,05$ ).

Paixão Côrtes (1998) observou que a redução do tempo de exposição para soluções altamente concentradas é fundamental, pois o baixo peso molecular do EG proporciona alta permeabilidade para o interior das células embrionárias em curto período de exposição (< 2min).

Apesar da utilização de soluções de vitrificação semelhantes, os resultados do presente experimento foram inferiores aos obtidos por Paixão Côrtes (1998), cujas taxas de sobrevivência foram de 91% (VS1) e 90% (VS2). Esta diferença pode ser explicada pelo estresse causado pelo manuseio dos embriões durante o cultivo *in vitro*, enquanto aquele autor trabalhou com BI murinos recém-coletados.

No experimento de viabilidade após vitrificação, 140 BI cultivados *in vitro* em meio KSOM e submetidos à vitrificação nas soluções VS1 e VS2 apresentaram resultados similares ( $P>0,05$ ) quanto às taxas de eclosão (Tab. 9), com tendência de melhor sobrevivência no grupo tratado com a solução VS1. Como estes achados já haviam sido observados no experimento 2, comprovou-se que tanto após-exposição como após-vitrificação, a adição dos crioprotetores em etapas (VS1) apresentou ligeira superioridade sobre a exposição direta (VS2), coincidindo também, com as observações de Zhu *et al.* (1993) e Paixão Côrtes (1998). Na opinião de Paixão Côrtes (1998), a exposição direta dos embriões à altas concentrações de EG, possivelmente, poderia causar danos irreversíveis na

organização do citoesqueleto das células embrionárias, produzindo menor número de Be.

Estes resultados foram superiores aos 25 e 26% de sobrevivência pós-descongelamento obtidos por Lopes (1989), que vitrificou BI murinos recém-coletados em solução 20% GLY + 0,5M SAC após equilíbrio em 10% GLY + 0,25MSAC por 10min e 10% GLY + 20% PG, respectivamente, e próximos aos 45,8% de Horlacher; Brem (1994) que utilizaram soluções compostas por 25% EG + 25% 1,2-PPD após equilíbrio por 10min em 10% EG + 20% 1,2-PPD.

Por outro lado, foram inferiores aos encontrados por Ishimori *et al.* (1991a, b) e Horlacher; Brem (1994), que utilizando uma mesma solução à base de 25% EG + 25% DMSO após equilíbrio em 12,5% EG + 12,5% DMSO por 5, 2 e 2min, respectivamente, obtiveram 79, 80 e 75,5% de eclosão. Da mesma forma, Miyake *et al.* (1993) e Zhu *et al.* (1993) expondo BI e Bx murinos diretamente à solução EFS40 (40% EG + 18% FICOLL + 0,3M SAC) por 2 e 5min, alcançaram 79 e 66% de eclosão, respectivamente.

Da literatura consultada, apenas Cseh *et al.* (1997) vitrificaram embriões de murinos em vários estádios de desenvolvimento, após o cultivo *in vitro* a partir de 1-célula em meio HTF + 4mg/ml BSA, em solução de 3M EG + 0,25M SAC +10% SFB após equilíbrio por 2min em vapor de N<sub>2</sub>L. As taxas de re-expansão observadas foram de 80% para Mo/Bj e 17% para

BI/Bx, grupo este bastante inferior aos da presente pesquisa. Estes autores afirmaram que o estágio de desenvolvimento em que os embriões foram sujeitos ao procedimento afetou a sobrevivência embrionária.

Os resultados da presente pesquisa vieram corroborar os de Paixão Côrtes (1998), que utilizando soluções de vitrificação semelhantes em BI murinos recém-coletados, registrou 49% (VS1) e 39% (VS2) de sobrevivência. Conforme este mesmo autor, a presença de 0,3M SAC na solução VS2, possivelmente, promoveu uma desidratação mais adequada impedindo uma maior permeação do EG, diminuindo os efeitos tóxicos da solução. Ressalte-se que estes ensaios representam a continuidade da linha de pesquisa em criopreservação de embriões de *Mus domesticus domesticus* do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A sobrevivência embrionária observada em VS1 (45,7%) e em VS2 (41,4%), utilizando-se a técnica descrita por Vajta *et al.* (1997) modificada na vitrificação de embriões cultivados, foi semelhante aos índices descritos por Paixão Côrtes (1998) que, trabalhando nas mesmas condições laboratoriais, obteve 49% em VS1 e 39% em VS2 após vitrificar BI recém coletados.

## 6. CONCLUSÕES

Dentro das condições em que foi conduzido o presente trabalho, pode-se concluir que:

- a) os meios HTF e KSOM acrescidos de 4mg/mL de BSA e 20 e 25mM de HEPES, respectivamente, são capazes de proporcionar o desenvolvimento *in vitro* a partir de embriões 1-célula *Mus domesticus domesticus* até o estágio de Be;
- b) a viabilidade embrionária dos BI *Mus domesticus domesticus* expostos às soluções VS1 e VS2 foi semelhante ao grupo controle;
- c) as soluções de vitrificação VS1 e VS2 mostraram-se eficientes ( $P>0,05$ ) para a vitrificação de BI *Mus domesticus domesticus* cultivados *in vitro*;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMCZUK, J.; SOLTER, D.; KOPROWSKI, H. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. **Development of Biology**, 61:378-383, 1977.
2. BAVISTER, BD. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. **Theriogenology**, 29(1):143-154, 1988.
3. BAVISTER, BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, 91-148, 1995.
4. BENSUADE, O.; BABINET, C.; MORANGE, M.; JACOB, F. Heat shock proteins: First major products activity in mouse embryo. **Nature**, 305:331-333, 1983.
5. BIGGERS, JD.; McLAREN, A . "Test tube" animals. The culture and transfer of early mammalian embryos *in vitro*. **Discovery**, 19:423-426, 1958.
6. BIGGERS, JD.; LAWITTS, JA.; LECHENE, CP. The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, 34:380-390, 1993.
7. BRINSTER, RL. Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. I. Effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. **J. Expl. Zool.**, 158:49-58, 1965.
8. BRINSTER, RL. Protein content of the mouse embryo during the first five days of development. **Journal of Reproduction and Fertility**, 13:413, 1967.
9. BROWN, JJG.; WHITTINGHAM, DG. The dynamic provision of different energy substrates improves development of one-cell random-bred mouse embryos *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, 95:503-511, 1992.
10. CARO, CM.; TROUNSON, A. The effect of protein on preimplantation mouse embryo development *in vitro*. **Journal of *in vitro* Fertility and Embryo Transfer**, 1:183-187, 1984.
11. CHATOT, CL.; ZIOMEK, CA.; BAVISTER, BD.; LEWIS, JL.; TORRES, I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, 86: 679-688, 1989.

12. CHATOT, CL.; TASCA, RJ.; ZIOMEK, CA. Glutamine uptake and utilization by preimplantation mouse embryos in CZB medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, 89: 335-346, 1990.
13. CHI, MMY.; MANCHESTER, JK.; YANG, VC.; CURATO, AD.; STRICKLER, RC.; LOWRY, OH. Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova. **Biology of Reproduction**, 39:295-307, 1988.
14. CONAGAHN, J.; HANDYSIDE, AH.; WINSTON, RML.; LEESE, HJ. Effects of piruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos *in vitro*. **Journal of Reproduciton and Fertility**, 99:87-95, 1993.
15. CRABTREE, HG. Observations on the carbohydrate metabolism of tumors. **Biochemistry**, 23:536-545, 1929.
16. CSEH, S.; CORSELLI, J.; NEHLSSEN-CANNARELLA, SL.; BAILEY, LL.; SZALAY, AA The effect of quick-freezing in ethilene glycol on morphologycal survival and *in vitro* development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages. **Theriogenology**, 48:43-50, 1997.
17. CSEH, S.; CORSELLI, J.; NEHLSSEN-CANNARELLA, SL.; BAILEY, LL.; SZALAY, AA. Direct rehydratation of morulae and early blastocyst mouse embryos rapidly frozen in ethylene glycol. **Theriogenology**, 49:164, 1998.
18. DAWSON, KM.; BALTZ, JM. Organic osmolytes and embryos: substrates of the GLY and  $\beta$  transport systems protect mouse zygotes against the effects of raised osmolarity. **Biology of Reproduction**, 56:1550-1558, 1997.
19. DULBECCO, R.; VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lineswith poliomyelits viruses. **Journal of Experimental Medicine**, 99:167-182, 1954.
20. EDWARDS, RG.; BAVISTER, BD.; STEPTOE, PC. Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vitro*. **Nature**, 221:632-635, 1969.
21. EDWARDS, RG.; STEPTOE, PC.; PURDY, JM. Fertilization and cleavage *in vitro* of preovulatory human oocytes. **Nature**, 227:1307-1309, 1970.
22. ERBACH, GT.; LAWITTS, JA.; PAPAIOANNOU, VE.; BIGGERS, JD. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. **Biology of Reproduction**, 50:1027-1033, 1994.

23. FITZGERALD, L.; DI MATTINA, M. Na improved medium for long-term culture of human embryos overcomes the *in vitro* developmental block and increases blastocyst formation. **Fertility and Sterility**, 57:641-647, 1992.
24. GARDNER, DK; LEESE, HJ. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, 88:361-368, 1990.
25. GODDARD, MJ.; PRATT, HPM. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: na analysis of the '2-cell block'. **Journal of Embryological and Experimental Morphology**, 73:111-133, 1983.
26. HAFEZ, ESE. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: \_\_\_\_\_, **Reprodução Animal**. 6<sup>a</sup>ed. São Paulo: Editora Manole, 1995. p. 513-535.
27. HAMMOND, J., Jr. Recovery and culture of tubal mouse ova. **Nature**, 163:28-29, 1949.
28. HO, Y.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, JJ.; SCHULTZ, RM. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: Augmentation by amino acids and analysis of gene expression. **Molecular Reproduction and Development**, 41:232-238, 1995.
29. HOGAN, B.; CONSTANTINI, F.; LACY, E. **Manipulating the mouse embryo - A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986. 332p.
30. HORLACHER, W.; BREM, G. Comparision of 3 different vitrification methods for cryopreserving mouse embryos. **Theriogenology**, 41:218, 1994.
31. HSIEH, B.; CHI, MMY.; KNOR, J.; LOWRY, OH. Enzymes of glycogen metabolism and related metabolites in preimplantation mouse embryos. **Development of Biology**, 72:342-349, 1979.
32. ISHIMORI, H.; TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Factors affecting survival of mouse blastocysts vitrified by a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. **Theriogenology**, 37:481-487, 1992a.
33. ISHIMORI, H.; TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Factors affecting survival of mouse blastocysts vitrified by a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. **Theriogenology**, 38:1175-1185, 1992b.
34. LAWITTS, JA; BIGGERS, JD. Overcoming the 2-cell block by modifying standart components in a mouse embryo culture medium. **Biology of Reproduction**, 45:245-251, 1991.

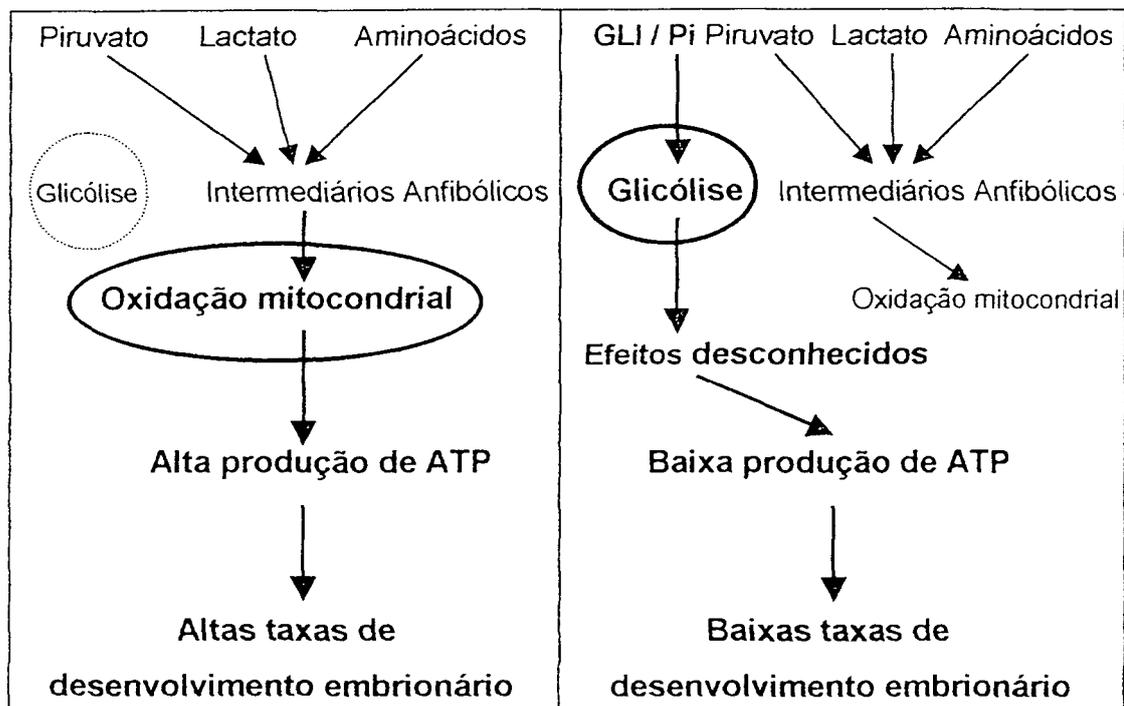
35. LEPPENS-LUISIER, G.; SAKKAS, D. Development, glycolytic activity and viability of preimplantation mouse embryos subjected to different periods of glucose starvation. **Biology of Reproduction**, 56:589-596, 1997.
36. LOPES, RFF. **Congelação ultra-rápida e vitrificação de embriões *Mus musculus***. Porto Alegre, Faculdade Veterinária, UFRGS, 1989. 134p. (Dissertação de Mestrado).
37. MAURER, HR. Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture. In: FRESHNEY, RI. **Animal Cell Culture: A Practical Approach**. Oxford University Press: Oxford, p.15-46, 1992.
38. MIYAKE, T.; KASAI, M.; ZHU, SE.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. **Theriogenology**, 40:121-134, 1993.
39. MONTAGNER, MM.; GONÇALVES, PBD.; COSTA, LFS.; BORTOLOTO, EB.; NEVES, JP.; MORALES, A.; CARÁMBULA, SF.; NICOLA, E.; STRANIERI, P. HEPES no desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro*. **Arquivos da Faculdade Veterinária da UFRGS**, 26(1):316, 1998.
40. MUGGLETON-HARRIS, A.; WHITTINGHAM, DG.; WILSON, L. Cytoplasmic control of preimplantation development *in vitro* in the mouse. **Nature**, 299:460-462, 1982.
41. O'NEILL, C. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. **Biology of Reproduction**, 56:229-237, 1997.
42. PAIXÃO CÔRTEZ, CG. **Sobrevivência *in vitro* e *in vivo* de embriões *Mus domesticus domesticus* vitrificados em 9,0M de etileno glicol**. Porto Alegre, Faculdade Veterinária, UFRGS, 1998. 110p. (Dissertação de Mestrado).
43. PRATT, HPM.; MUGGLETON-HARRIS, A. Cycling cytoplasmic factors that promote mitosis in the cultured 2-cell mouse embryo. **Development**, 104:115-120, 1988.
44. QUINN, P.; WARNES, GM.; KERIN, JF.; KIRBY, C. Culture factors affecting the success rate of IVF and embryo transfer. **Ann NY Academic Science**, 442:195-199, 1985.
45. SCHINI, SA.; BAVISTER, BD. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. **Biology of Reproduction**, 39:1183-1192, 1988.

46. SESHAGIRI, PB.; BAVISTER, BD. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the "Crabtree Effect". **Molecular Reproduction and Development**, 30:105-111, 1991.
47. STRINGFELLOW, DA.; SEIDEL, SM. **Manual of the International Embryo Society**. 3<sup>rd</sup> Edition. IETS. Savoy, Illinois, 1998. 174p.
48. SUMMERS, MC.; BHATNAGAR, PR.; LAWITTS, JA.; BIGGERS, JD. Fertilization *in vitro* of mouse ova from inbred and outbred strains: complete preimplantation embryo development in glucose-supplemented KSOM. **Biology of Reproduction**, 53:431-437, 1995.
49. TELFORD, NA; WATSON, AJ; SCHULTZ, GA . Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, 26:90-100, 1990.
50. THOMASSEN, DG. Variable responsiveness of rat tracheal epithelial cells to BSA in serum-free culture. **In vitro Cell Development and Biology**, 25:1046-1050, 1989.
51. VAJTA, G.; BOOTH, P.J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The use of the Open Pulled Straw (OPS) method for vitrification of day 2-8 *in vitro* produced bovine embryos. **13<sup>e</sup> Réunion AETE**. Lyon, 1997. p.204.
52. VALDEZ, CA.; ABAS MAZNI, O.; TAKAHASHI, Y.; FUJIKAWA, S.; KANAGAWA, H. Successful cryopreservation of mouse blastocysts using a new vitrification solution. **Journal of Reproduction and Fertility**, 96:793-802, 1992.
53. VAN WINKLE, L.J.; HAGHIGHAT, N.; CAMPIONE, AL. Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect of development of the inorganic ions in oviductal fluid. **J. Exp. Zool.**, 253:215-219, 1990.
54. WHITTEN, WK. Culture of tubal mouse ova. **Nature**, 177:96, 1956.
55. WHITTEN, WK.; BIGGERS, JD. Complete development *in vitro* of the preimplantation stages of the mouse in a simple, chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, 17:399-401, 1968.
56. WHITTINGHAM, DG. Biochemical aspects of early gestation. **Congenital malformations**. Excerpta Medica International Series, 204:147-156, 1969.
57. WHITTINGHAM, DG. Culture of mouse ova. **Journal of Reproduction and Fertility (Suppl.)**, 14:7-21, 1971.

58. WÜTTKE, WA.; WALZ, W. Sodium- and bicarbonate-independent regulation of intracellular pH in cultured mouse astrocytes. **Neuroscience Letters**, 117:105-110, 1990.
59. YOSHIOKA, K.; OTHMAN, AM.; TANIGUCHI, T.; YAMANAKA, H.; SEKIKAWA, K. Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. **Theriogenology**, 48:997-1006, 1997.
60. ZIGLER, JS.; LEPE-ZUNIGA, JL.; VISTICA, B.; GERY, I. Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. *In vitro Cell Development and Biology*, 21:282-287, 1985.
61. ZHU, SE.; KASAI, M.; OTOGE, H.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. Cryopreservation of mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. **Journal of Reproduction and Fertility**, 98:139-145, 1993.

**ANEXO**

Figura 1. Representação esquemática da eficiência relativa da glicólise e oxidação mitocondrial no cultivo *in vitro* de embriões de 8-células de hamster na ausência e presença de GLI / Pi.



Fonte: Adaptado de Seshagiri; Bavister (1991).