UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)
CAMPUS DE BOTUCATU
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE O
DESENVILVIMENTO EMBRIONÁRIO PRÉ-IMPLANTACIONAL**

REBECA COLAUTO MILANEZI DE SOUZA

BOTUCATU-SP

2017

REBECA COLAUTO MILANEZI DE SOUZA

**EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRÉ-IMPLANTACIONAL**

Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão do curso de graduação em Ciências Biomédicas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu.

Orientador: Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

BOTUCATU-SP

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Jesus, pois sem ele não teria razões para seguir nesta jornada.

Agradeço ao meu marido André, por ter sido um excelente companheiro com seu amor, paciência, compreensão e incentivo que foram de fundamental importância para a conclusão do meu trabalho.

Agradeço aos meus pais Sérgio e Maria, que estiveram presentes a todo o momento me apoiando no que foi necessário. Sou eternamente grata por tudo o que fizeram.

Agradeço aos meus irmãos, Rachel e Rafael, e ao meu cunhado Andreo que de uma maneira ou de outra, me apoiaram e incentivaram em todas as minhas escolhas.

Agradeço a minha orientadora Profa. Fernanda Cruz Landim, por ter me dado a oportunidade de estagiar em um laboratório de excelência e pela oportunidade de aprendizado e pelo apoio.

Agradeço a todos do Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA), especialmente à Carol e à Laís, pelos conhecimentos passados, para que eu pudesse formar o meu.

Agradeço ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelas orientações durante o estágio curricular.

Agradeço a todos professores do curso pelo aprendizado, pela compreensão e incentivo.

Agradeço à coordenação da graduação pela disponibilidade e apoio.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente foram de fundamental importância para a conquista desta vitória.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP:	Adenosina trifostato
BGCCM:	<i>Bovine granulosa cell conditioned medium</i>
BME:	<i>Basal medium Eagle</i>
BOCM:	Bovine oviduct conditioned medium
BRL:	<i>Buffalo rat liver</i>
BRLCM:	<i>Buffalo rat liver conditioned medium</i>
BSA:	<i>Bovine serum albumin</i>
EGF:	<i>Epidermal growth factor</i>
ERO:	Espécies reativas de oxigênio
FGF:	<i>Fibroblast growth factor</i>
GSH:	Glutathione
hpi:	horas pós-inseminação
IGF:	<i>Insulin growth factor</i>
MCI:	Massa celular interna
MEM:	<i>Minimal essential medium</i>
PIVE:	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PDGF:	<i>Platelet growth factor</i>
PIVE:	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PVA:	<i>Polyvinyl alcohol</i>
SFB:	Soro fetal bovino
SOD:	Superóxido dismutase
TE:	Trofectorma
TGF:	<i>Transforming growth factor</i>

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 DESENVOLVIMENTO PRÉ-IMPLANTACIONAL DE EMBRIÕES BOVINOS ..	9
2.2 SISTEMAS DE CULTIVO EMBRIONÁRIO	11
2.2.1 MEIO DE CULTIVO QUIMICAMENTE INDEFINIDO	11
2.2.2 MEIO DE CULTIVO QUIMICAMENTE SEMI-DEFINIDO	12
2.2.3 MEIO DE CULTIVO QUIMICAMENTE DEFINIDO	13
2.2.4 MEIO SEQUENCIAL	21
2.2.5 CO-CULTIVO COM CÉLULAS SOMÁTICAS	22
2.2.6 MEIO CONDICIONADO	24
2.3 CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE O CULTIVO	25
2.3.1 PRESSÃO GASOSA	25
2.3.2 TEMPERATURA	27
2.3.3 CULTIVO EM GRUPO E CULTIVO ISOLADO	27
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
4. REFERÊNCIAS	30

RESUMO

Os eventos experimentados pelo embrião durante o período pré-implantacional são muito importantes e susceptíveis, uma vez que podem afetar o processo de implantação e, conseqüentemente, o desenvolvimento gestacional. Diversos estudos têm sido realizados em meio de cultivo para analisar os fatores e condições associados a estes eventos na tentativa de aumentar as taxas de produção de blastocistos e a qualidade dos embriões. Os sistemas e condições físico-químicas empregados durante o co-cultivo buscam simular as condições encontradas no ambiente materno, mediante o conhecimento de que as células epiteliais e mesenquimais do trato reprodutivo da fêmea possuem a capacidade de secretar diversas substâncias. É também reconhecido que o uso convencional do Soro Fetal Bovino (SFB) resulta em taxas de produção de blastocistos mais baixas (cerca de 30 a 50%) comparado à produção de embriões *in vivo* (cerca de 70%), lembrando que o seu papel sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional permanece indefinido. Desta forma, a proposta do presente estudo será apresentar uma breve revisão de literatura sobre os efeitos de diferentes sistemas de cultivo e condições físico-químicas sobre o processo de desenvolvimento embrionário pré-implantacional.

Palavras-chave: pré-implantacional, embrião, bovino, cultivo *in vitro*, sistemas de cultivo, condições físico-químicas.

ABSTRACT

The events experienced by the embryo during the pre-implantation period are very important and susceptible, since they can affect the implantation process and, consequently, the gestational development. Several studies on the conditions associated with these events were performed in the attempt to increase blastocysts rates and embryo quality. The systems and physical-chemical conditions employed during co-cultivation seek to simulate the conditions found in the maternal environment, through the knowledge that epithelial and mesenchymal cells of the female's reproductive tract have the ability to secrete various substances. It is also recognized that the conventional use of Bovine Fetal Serum (BFS) results in lower production rates of blastocysts (about 30 to 50%) compared to embryo production *in vivo* (about 70%), noting that its role in pre-implantation embryonic development is still indefinite. In this way, a proposal of this study is to review the *in vitro* systems and physical-chemical conditions on the process of pre-implantation embryonic development.

Keywords: pre-implantation, embryo, bovine, in vitro culture, culture systems, physical-chemical conditions.

1. INTRODUÇÃO

A fecundação do oócito pelo espermatozoide, com conseguinte união dos pró-núcleos materno e paterno, resulta na formação do zigoto, o qual dirige-se através do oviduto em direção ao útero, a fim de que ocorra a implantação embrionária no endométrio. Portanto, o desenvolvimento pré-implantacional compreende o período em que o embrião, formado no oviduto, percorre o caminho em direção ao útero para implantar-se no endométrio, a fim de viabilizar o desenvolvimento e crescimento embrionário e fetal. Conseqüentemente, neste período, a sucessão dos eventos experimentados pelo embrião é de suma importância, uma vez que podem afetar o processo de implantação e conseqüente desenvolvimento gestacional (GANDOLFI *et al.* 1993).

Nesta linha de investigação, diversos estudos tem sido realizados com o objetivo de elucidar os fatores e moléculas envolvidos no processo de desenvolvimento embrionário, bem como os seus efeitos sobre a produção de blastocistos produzidos *in vitro*. Uma variedade de sistemas e procedimentos de cultivo têm-se estabelecido e são criados na tentativa propiciar um ambiente *in vitro* adequado ao desenvolvimento embrionário. O uso de sistemas convencionais para produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos necessita ser melhorado, devido a reduzida produção de blastocistos (cerca de 35 a 50%) comparado aos índices observados *in vivo* (cerca de 70%) (RIZOS *et al.* 2002).

Portanto, o entendimento dos fatores que controlam o desenvolvimento embrionário pré-implantacional é de extrema relevância teórico-prática, pois permite ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na passagem do embrião através do oviduto, além de potencializar a fertilidade de animais de interesse na pecuária, mediante o uso de biotécnicas reprodutivas (ex: PIVE). Vale destacar a importância de se aprimorar a qualidade e produção embrionária, bem como a contribuição do modelo animal bovino como uma potencial estratégia para o estudo da fisiologia reprodutiva humana (MÉNÉZO *et al.* 2000).

Assim, o objetivo deste estudo será apresentar uma breve revisão de literatura sobre os efeitos de diferentes sistemas de cultivo e condições físico-químicas utilizados na prática laboratorial da PIVE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESENVOLVIMENTO PRÉ-IMPLANTACIONAL DE EMBRIÕES BOVINOS

O período pós-fertilização tem um grande impacto, principalmente sobre a qualidade do blastocisto (RIZOS *et al.* 2002). Vários são os eventos importantes que ocorrem durante a passagem do embrião no oviduto. Entre eles estão: 1) as primeiras clivagens, consideradas como indicadores do desenvolvimento potencial subsequente (LONERGAN *et al.* 1999a), 2) ativação da transcrição do genoma embrionário durante o estágio de 8 a 16 células (4^o ciclo celular de divisão), no qual há a alteração do controle genômico materno para regulação das proteínas sintetizadas pelo embrião (BARNES e EYESTONE, 1990), 3) compactação da mórula, estabelecendo-se o contato célula-célula entre os blastômeros e 4) a formação do blastocisto, envolvendo a formação dos dois principais tipos celulares do embrião, o trofotoderma e a massa celular interna (GANDOLFI *et al.* 1993).

Durante o período pré-implantacional ocorrem diversas alterações morfológicas no embrião *in vivo*, incluindo a primeira clivagem, que se caracteriza pela divisão dos blastômeros – unidade celular resultante da divisão das células embrionárias -, no período de 24-36 horas pós-inseminação (hpi). Sucessivamente, as divisões consecutivas levam a formação da mórula - estrutura formada por 32 blastômeros no período de 72-120 hpi. Durante seu processo de compactação, a mórula compacta adquire cerca de 32-64 células, e neste momento os blastômeros mantêm-se ainda totipotentes. Segue-se o surgimento do blastocisto inicial após aproximadamente 68 hpi, com 100-200 células, podendo ser visualizada a diferenciação entre a porção de células que forma o trofotoderma (TE) e a porção que forma a massa celular interna (MCI). O TE é formado por células já diferenciadas, que compõem um epitélio de transporte responsável pelo crescimento da blastocele e pela formação das células que irão permitir implantação do embrião na cavidade uterina. A MCI, por sua vez, levará à formação do embrião e posteriormente ao feto. O blastocisto possui um número de células semelhantes ao blastocisto inicial, no entanto, neste momento, a diferenciação entre a MCI e TE é mais facilmente visualizada. O blastocisto continua crescendo e transforma-se no blastocisto expandido, com mais de 200 células. O diâmetro maior é ocasionado pelo aumento de volume dentro da blastocele, o que acaba levando à ruptura da zona pelúcida (ZP) e, assim, à formação do blastocisto

eclodido, o qual não apresenta ZP e contém cerca de 200-800 células (SENGER, 2003).

Portanto, os procedimentos e técnicas de PIVE devem assegurar a sincronização entre o estágio embrionário e a composição do meio de acordo com local de desenvolvimento, a fim de promover o crescimento pré-implantacional (GANDOLFI *et al.* 1993). De maneira geral, o potencial de desenvolvimento embrionário é sobretudo influenciado e determinado pelas condições de cultivo, podendo também relacionar-se à qualidade dos gametas envolvidos, com maior destaque ao oócito, e pela cinética das primeiras clivagens. Referente às condições de cultivo, comparando-se os embriões produzidos *in vitro* com aqueles produzidos *in vivo*, os embriões *in vitro* apresentam uma qualidade muito inferior (RIZOS *et al.* 2002). Isto é evidenciado pelas diferenças morfológicas, metabólicas, grau de fragmentação dos blastômeros, diferenças no número total de células, no número de células apoptóticas e na proporção MCI:TE, na criotolerância, na expressão relativa de transcritos, além no tempo para atingir os estágio de desenvolvimento. Sendo assim, estes parâmetros podem ser considerados marcadores da qualidade embrionária, fornecendo uma visão mais completa dos processos celulares e moleculares relacionados às alterações da composição dos diferentes meios (RIZOS *et al.* 2002).

Além dessas características diferenciais entre os embriões produzidos *in vivo* e aqueles produzidos *in vitro*, é reconhecido dentre as técnicas de produção de embriões *in vitro*, que o desenvolvimento embrionário bovino é bloqueado entre o estágio de 8-16 células (CAMOUS *et al.* 1984), fato este que não ocorre durante o desenvolvimento *in vivo*. É importante evidenciar que esta parada no desenvolvimento é concomitante com a alteração do controle genômico materno para o embrionário, o que permite inferir que as condições e os meios de cultivo tradicionalmente utilizados são deficientes e escassos em moléculas relacionadas à ativação transcricional do embrião. Sem a ativação da expressão gênica embrionária não ocorre as divisões mitóticas dos blastômeros (BARNES e EYSTONE, 1990).

2.2 SISTEMAS DE CULTIVO EMBRIONÁRIO

2.2.1 MEIO DE CULTIVO QUIMICAMENTE INDEFINIDO

Os meios de cultivo que apresentam componentes não identificados e/ou em concentrações desconhecidas são chamados de Meios Quimicamente Indefinidos. Este é o caso dos meios que utilizam soro fetal bovino (SFB) e/ou albumina sérica (REHMAN *et al.* 2001). Esta indefinição relaciona-se a grande variabilidade biológica (entre os diversos tipos de moléculas e suas concentrações) encontrada dentre os lotes produzidos destes meios, uma vez que apresentam uma mistura de soro proveniente de diferentes animais e, também, pelo fato de apresentarem alto risco de transmissão de agentes infecciosos e possibilidade da presença de contaminantes (BAVISTER, 1995).

O SFB é obtido da parte líquida após a coagulação sangue de fetos bovinos, contendo muitos constituintes como proteínas, aminoácidos, hormônios, fatores de crescimento, citocinas, vitaminas, quelantes. A mais abundante molécula presente neste meio é a albumina sérica bovina (do inglês: *bovine serum albumin*; BSA). Dentre as suas principais funções, incluem: 1) papel nutricional como fonte proteica, 2) controle do pH, 3) quelantes de metais pesados, e 4) apresenta propriedade surfactante, impedindo a ligação inespecífica dos embriões às placas de cultivo (de vidro ou plástico). Embora seja realizado o isolamento da BSA para a sua posterior utilização na produção de embriões, ela ainda apresenta alto risco de contaminação, tanto por patógenos ou outras moléculas, como pela alta variabilidade em sua concentração e/ou natureza. Assim, meios com BSA também tem sido considerados quimicamente indefinidos (PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1994).

O SFB ou BSA são as fontes proteicas mais utilizadas como suplemento do meio de cultura para a PIVE. Embora seja um sistema de cultivo com taxas significativas de blastocistos produzidos, o SFB tem seu papel não muito determinado. Sugere-se que apresente em sua composição: 1) fatores embriotróficos, como fatores de crescimento e nutrientes essenciais para o crescimento do embrião e, 2) fatores que inibam a destruição embrionária, protegendo os embriões dos efeitos deletérios dos metais pesados e das espécies reativas de oxigênio (ERO), ou de outros componentes prejudiciais (BAVISTER, 1995).

Pinyopummintr e Bavister (1991) defenderam a ideia de que o SFB apresenta um efeito bifásico: quando adicionado ao meio de cultivo, a presença do soro no estágio inicial de desenvolvimento, pode impedir as primeiras clivagens e, em seguida, promover e acelerar o desenvolvimento do embrião ao estágio de mórula e blastocisto. Portanto, a suplementação com soro tem-se tornado mais efetiva quando adicionado antes do estágio de 8-16 células, resultando no aumento das taxas de blastocistos e blastocistos com maior número de células. Além disso, o SFB acelera o aparecimento de blastocistos, comparado aos meios de cultivo livre de soro (BAVISTER *et al.* 1992; LIM *et al.* 1994; PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1994; BAVISTER, 1995; LANGENDONCKT *et al.* 1997).

Embora apresente taxas de produção superiores em relação aos demais sistemas de cultivo, são muitas as desvantagens da suplementação do soro nos meios de cultivo. Uma delas, anteriormente apresentada, é que a sua composição é altamente indefinida e variável de um lote a outro e entre os diferentes fornecedores, impedindo assim a reprodutibilidade das proporções de blastocistos produzidos (BAVISTER, 1995). Além disso, existe uma alta possibilidade de contaminação do meio por patógenos. Outros estudos demonstram que a exposição prolongada dos embriões ao soro podem afetar grandemente a morfologia, a ultraestrutura e a bioquímica embrionárias (ABE *et al.* 1999). Pode também estar relacionado com o aumento de peso do feto ao nascimento – Síndrome do Bezerro Gigante – e a outros problemas, resultando em maiores taxas de mortalidade (WALKER *et al.* 1996). Rizos *et al.* (2003) demonstraram que a retirada do soro pode aumentar a criotolerância, além de alterar perfis de transcritos relacionados ao desenvolvimento, como por exemplo, a expressão aumentada de *Bax* na presença de soro. O *Bax* é um transcrito relacionado à apoptose que serve como um marcador da qualidade embrionária, que neste caso, demonstra a qualidade inferior dos blastocistos suplementados.

2.2.2 MEIO DE CULTIVO QUIMICAMENTE SEMI-DEFINIDO

Este tipo de meio diferencia-se dos meios de cultivo quimicamente indefinidos, por fornecer a suplementação de soro e/ou BSA em estágios mais tardios do desenvolvimento. Produzem taxas de blastocistos superiores às aquelas produzidas nos meios de cultivo quimicamente definidos, provavelmente pela adição de soro durante os estágios de desenvolvimento mais propícios para a estimulação (após estágio de 8-

16 células) (TAKAGI *et al.* 1991; KIM *et al.* 1993; LIM *et al.* 1994; CAROLAN *et al.* 1995; KRISHER *et al.* 1999).

2.2.3 MEIO DE CULTIVO QUIMICAMENTE DEFINIDO

Também conhecidas como meio livre se soro, são definidos como meios de composição química conhecida (REHMAN *et al.* 2001). Foram criados a partir da tentativa de elucidar os mecanismos regulatórios entre o intercuro células-embrião, tanto pelas células provenientes do co-cultivo, como pelo ambiente materno. Portanto, este tipo de meio é principalmente empregado para a determinação das reações bioquímicas e das atividade funcionais das moléculas adicionadas, além de permitir inferir sobre o seu papel no desenvolvimento embrionário (CAROLAN *et al.* 1995; THOMPSON, 2000). Lembrando que essas moléculas podem também suplementar meios quimicamente indefinidos ou semi-definidos (meios com soro e/ou BSA).

Diferentemente dos meios suplementados com soro, os meios quimicamente definidos reduzem a variabilidade dos resultados e das taxas de blastocistos obtidas entre os diferentes laboratórios de PIVE (CAROLAN *et al.* 1995; WRENZYCKI *et al.* 2001). Algumas limitações do uso desse tipo de meio, incluem: 1) desconhecimento das origens das substâncias exógenas e suas respectivas diferenças funcionais e estruturais com a molécula nativa (por exemplo, meia-vida) e 2) desconhecimento do momento de seu surgimento e de sua concentração fisiológica dentro da matriz extracelular do oviduto (YANG *et al.* 1993).

Os componentes incluídos neste tipo de meio podem ser de diferentes categorias bioquímicas, conforme a seguir:

– PROTEÍNAS

Na tentativa de diminuir ou eliminar a suplementação com SFB e/ou BSA, diversas proteínas (semissintéticas ou sintéticas), de estrutura e concentração conhecidas, são utilizadas nos meios de cultivo. A principal escolha tem sido o álcool polivinílico (do inglês: *polyvinyl alcohol*; PVA) um polímero sintético hidrossolúvel que apresenta-se como surfactante, assim como a albumina, impedindo a ligação inespecífica dos embriões a artefatos (THOMPSON, 2000).

Entretanto, o PVA quando adicionado ao meio de cultivo definido, resulta em menores taxas de blastocistos, que apresentam menor número de células, comparado ao uso do BSA ou soro (ECKERT e NIEMANN, 1995; KESKINTEPE e BRACKETT, 1996; LONERGAN *et al.* 1999b). Isto pode ser devido às diferenças na absorção por pinocitose das duas moléculas, uma vez que a síntese proteica é necessária para o processo de proliferação celular dos blastômeros. Em suma, o uso do PVA significa menores taxas de blastocistos, menor capacidade metabólica, menor conteúdo proteico e criotolerância reduzida, comparado ao BSA. Isso porque o PVA não é capaz de fornecer fatores de crescimento e nutrientes ao embrião e nem é capaz de ligar-se aos metais pesados como o BSA (THOMPSON, 2000).

Lane *et al.* (2003) incluíram no meio de cultivo a albumina recombinante, uma versão da albumina altamente purificada, sem a presença de potenciais contaminantes e sem outras moléculas desconhecidas (diferentemente do BSA) e também de ácido hialurônico, um glicosaminoglicano. Os autores demonstraram que os blastocistos formados nesse meio continham o número de células, o desenvolvimento da MCI, o metabolismo e os níveis de síntese proteica semelhantes àqueles obtidos com o uso do BSA. Adicionalmente, o número de embriões que retomaram o crescimento após a criopreservação no grupo com a albumina recombinante e ácido hialurônico foi maior do que no grupo com BSA. No entanto, o número de blastocistos expandidos foi menor quando comparado novamente ao grupo de BSA (LANE *et al.* 2003). O benefício da adição do ácido hialurônico na implantação pode estar relacionado à capacidade desta molécula em formar uma camada imunogênica protetiva ao redor do embrião, além de aumentar a angiogênese, importante para a difusão de nutrientes e metabólitos entre o ambiente materno e o feto (GARDNER e LANE, 1998).

– CARBOIDRATOS

Os carboidratos são biomoléculas compostas principalmente por carbono, hidrogênio e oxigênio, responsáveis por fornecer energia (Adenosina trifosfato, ATP) às células. Os principais substratos energéticos envolvidos na nutrição do embrião são: carboidratos (ex: glicose), piruvato e lactato. Portanto, a atividade metabólica

pode ser obtida através da quantificação do consumo de substratos (THOMPSON, 1996; THOMPSON, 2000).

De maneira geral, a energia para a formação do embrião até o estágio de pré-compactação da mórula é proveniente das moléculas de ATP geradas por meio da fosforilação oxidativa, sendo, portanto, oxidado piruvato e lactato durante este estágio. Com o início da compactação e blastulação, devido ao aumento das necessidades energéticas requerido para a cavitação da blastocela, a glicose é utilizada em maiores proporções, sendo metabolizada através da via glicolítica. Isto significa que até 72 a 96 hpi dispensa-se a suplementação de glicose. O consumo de piruvato continua a aumentar após a formação da mórula, indicando assim que o metabolismo oxidativo tem um importante papel na formação de blastocistos (PINYOPUMMINTR e BAVISTER 1991; KIM *et al.* 1993; GARDNER e LANE, 1998; KRISHER *et al.* 1999; THOMPSON, 2000).

Tem sido demonstrado que na ausência de glicose, a adição de lactato ou piruvato durante estágios iniciais melhorou o desenvolvimento e permitiu a formação de embriões de mais de 8-células (KIM *et al.* 1993). Evidenciou-se também a inabilidade da glicose, adicionada isoladamente ou em conjunto com o lactato e piruvato, em manter o desenvolvimento de zigotos ao estágio de 8-16 células e de mórulas (TAKAHASHI e FIRST, 1992; KIM *et al.* 1993; KRISHER *et al.* 1999). Esta inibição, provocada pela presença de glicose e/ou ausência de lactato e piruvato, pode, por conseguinte, estar vinculada ao bloqueio do desenvolvimento no estágio de 8-16 células (KIM *et al.* 1993). Adicionada com o fosfato, a glicose pode apresentar este mesmo efeito de inibição, levando ao bloqueio do estágio 8-16 células (PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1991).

Portanto, os estudos supracitados sugerem que diferentes substratos são utilizados em diferentes estágios de desenvolvimento, de acordo com as diferentes necessidades do embrião. Estas alterações tem importância fisiológica, quando consideramos que há alterações das vias de metabolismo, dependendo do local que se encontra o embrião (GARDNER e LANE, 1997).

– LIPÍDEOS E ÁCIDOS GRAXOS

As necessidades energéticas dos embriões bovinos parecem estar apenas associadas ao metabolismo energético dos carboidratos. Por isso, são poucos os estudos que investigaram a inclusão de lipídeos e ácidos graxos no meio de cultivo, embora as secreções e fluidos do trato reprodutivo das fêmeas contenham várias dessas moléculas (THOMPSON, 1996). O que se tem conhecimento sobre os lipídeos é que os embriões produzidos *in vitro* apresentam diferenças ultraestruturas relacionado ao conteúdo de lipídeos, comparado aos embriões produzidos *in vivo*. Em embriões produzidos *in vitro* há um maior acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma e isso se dá pela insuficiência do metabolismo energético pela mitocôndria. Essas gotas citoplasmáticas estão relacionadas com menor criotolerância dos embriões *in vitro* (ABE *et al.* 1999).

- AMINOÁCIDOS E VITAMINAS

Os aminoácidos são moléculas fundamentais para a formação de polipeptídios e proteínas. Já as vitaminas são coenzimas fundamentais do processo metabólico de carboidratos e de aminoácidos, funcionando como potentes antioxidantes e protegendo as células da ação dos ERO, os quais podem provocar a inativação de enzimas e alterações nas membranas celulares e no DNA (GUERIN *et al.* 2001). A adição dessas moléculas aos meios de cultivo de PIVE são obtidos por dois tipos principais de meios: Meio Basal de *Eagle* (do inglês: *basal medium Eagle*; BME) e Meio Essencial Mínimo (do inglês: *minimal essential medium*; MEM). Ambos contém uma mistura de sais, aminoácidos (essenciais e não essenciais) e vitaminas essenciais ao crescimento e manutenção celular. A diferença entre esses dois meios, é que o MEM apresenta mais componentes, atendendo a mais requisitos nutricionais do que o BME (TAKAHASHI e FIRST, 1992).

Alguns estudos determinam que a adição desses meios ao cultivo influenciam de maneira positiva o desenvolvimento embrionário inicial e a produção de mórulas, além de aumentar o número de células dos blastocistos, uma vez que as vitaminas presentes no MEM não exercem efeito algum para esta condição (TAKAHASHI e FIRST, 1992, GARDNER *et al.* 1994). Portanto, os aminoácidos atuam benéficamente

durante o estágio de clivagem, sendo importante adicioná-los durante o início do período de cultivo (GARDNER e LANE, 1998).

Sabe-se que a MCI e o TE requerem diferentes aminoácidos, sendo evidenciado maior consumo de aminoácidos essenciais pela MCI e maior consumo de aminoácidos não essenciais e glutamina pelo TE (GARNER e LANE, 1998).

A vitamina E, ou também denominada de α -tocoferol, é um antioxidante lipossolúvel, que protege os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares da ocorrência de peroxidação lipídica, promovida pelas ERO (GUERIN *et al.* 2001). Tem sido demonstrado que a adição dessa vitamina ao meio de cultivo aumenta o número de blastocistos expandidos e proporciona aumento do tamanho dos embriões transferidos e coletados, comparado ao grupo controle (sem vitamina E) (OLSON e SEIDEL, 2000). Portanto, os autores sugerem um efeito protetivo dessa molécula.

A glutatona é um antioxidante hidrossolúvel que, em sua forma reduzida (GSH) também promove proteção contra os radicais superóxido e hidroxila, além de catalisar a reação de redução da H_2O_2 , levando à formação de H_2O . A GSH pode melhorar as condições de desenvolvimento, principalmente 144 hpi. Além disso, a adição simultânea de GSH com superóxido dismutase (SOD), outro antioxidante, resulta no aumento da quantidade de mórulas e blastocistos (LUVONI *et al.* 1996).

Não se sabe ao certo o mecanismo pelo qual os aminoácidos e as vitaminas melhoram as condições de desenvolvimento embrionário. Sugere-se que a suplementação com aminoácidos exógenos pode aumentar a proporção de aminoácidos endógenos, favorecendo assim a síntese proteica - necessária para a proliferação celular (TAKAHASHI e FIRST, 1992).

É importante ressaltar que o metabolismo dos aminoácidos leva a formação de íons amônio, sendo estes metabólicos prejudiciais ao desenvolvimento embrionário (GARDNER *et al.* 1994), principalmente no que se refere à Síndrome do Bezerro Gigante. Por isso, é importante, quando na utilização de MEM ou BME, realizar-se trocas de meio durante o cultivo ou adicionar vitaminas/antioxidantes que inibam as ERO e espécies reativas de nitrogênio (GARDNER *et al.* 1994).

– FATORES DE CRESCIMENTO, CITOCINAS E MATRIX EXTRACELULAR

Os fatores de crescimento e as citocinas são, em sua grande maioria, polipeptídios responsáveis pela comunicação entre as células. As ações dos fatores de crescimento e citocinas incluem efeitos diretos no desenvolvimento do embrião, aumentando a proliferação e diferenciação celular, além de exercer influências no ambiente uterino. Portanto, atuam de duas maneiras: autócrina e/ou parácrina (WATSON *et al.* 1992).

As células epiteliais e mesenquimais do oviduto secretam diversas substâncias, como citocinas, hormônios e fatores de crescimento para a matriz extracelular – local de passagem do embrião. Os embriões, por sua vez, também são responsáveis por secretar diversos fatores e apresentam vários dos seus receptores (WATSON *et al.* 1992). Dentre os fatores de crescimento, incluem: o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), o fator transformante de crescimento alfa (TGF- α), o fator transformante de crescimento beta (TGF- β), o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I), o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), dentre outros (LARSON *et al.* 1992a; LARSON *et al.* 1992b; YANG *et al.* 1993; THIBODEAUX *et al.* 1993; , LEE e FUKUI, 1995; MATSUI *et al.* 1995; LONERGAN *et al.* 1996). Portanto, muitos desses fatores estão envolvidos na regulação promovida pelas células epiteliais e, na tentativa de mimetizar as condições encontradas no trato reprodutivo da fêmea, essas moléculas vêm sendo incluídas nos meios de cultivo.

Estas moléculas secretadas exercem seus efeitos biológicos através da ligação aos seus respectivos receptores, presentes principalmente na superfície celular de embriões, levando a sinalização celular de segundo mensageiros, com o consequente aumento da síntese proteica e de ácidos nucleicos (HILL, 1989). Por exemplo, o EGF atua sobre seu receptor, presente na membrana plasmática de embriões de roedores, impulsionando a divisão dos blastômeros e assim a formação do blastocisto (WOOD e KAYE, 1989). Uma característica da secreção dos fatores de crescimento e de seus receptores é a expressão diferencial, conforme o estágio de desenvolvimento e a espécie animal do embrião (HEYNER *et al.* 1993).

Com relação ao EGF, poucos são os trabalhos na literatura que relatam o seu efeito sobre o cultivo quimicamente definido de embriões bovinos, sendo que a maioria

dos estudos o relatam presente no SFB. Lonergan *et al.* (1996) relataram que, sobre condições de cultivo quimicamente definido, EGF pode estimular a eclosão dos blastocistos, pelo aumento do acúmulo de líquido na blastocele. Outros demonstraram aumento nas taxas de desenvolvimento mais tardios (estágio de blastocisto), sem aumento do número de células dos blastocistos, quando o EGF foi adicionado ao estágio de mórula e/ou blastocistos iniciais (YANG *et al.* 1993). Além disso, a sua ligação limita-se às células do trofotoderma, causando a proliferação desse tipo celular (THIBODEAUX *et al.* 1993; LEE e FUKUI, 1995).

Similar ao EGF, o FGF também estimula a formação de blastocisto e o aumento do número de células em estágios tardios (LEE e FUKUI, 1995). A adição de ambos os fatores simultaneamente, EGF e FGF estimulam sinergicamente o desenvolvimento de mórulas e blastocistos iniciais, possuindo efeito mitógeno sobre as células embrionárias. Lembrando que esta estimulação só é evidenciada quando há condições de cultivo isolado de embriões e considerando também que as taxas de blastocistos são menores, comparadas às obtidas com o uso do soro (LEE e FUKUI, 1995).

As diferentes moléculas de IGF estão envolvidas na síntese de DNA. Matsui *et al.* (1995) sugerem que a adição de IGF-I ao cultivo proporciona maior desenvolvimento de mórulas. Outros indicam um efeito benéfico do IGF-I sobre o desenvolvimento de blastocistos, aumentando também o número de células (SIRISATHIEN *et al.* 2003). Além disso, tem sido evidenciado que o IGF-I apresenta uma função anti-apoptótica durante o desenvolvimento pré-implantacional (BYRNE *et al.* 2002).

Com relação ao TGF- β , o fator pareceu não ter efeito sobre a estimulação do desenvolvimento, uma vez que o seu papel foi apenas vinculado ao aumento do número de receptores de EGF (KEEFER, 1992; FLOOD *et al.* 1993). No entanto, para Yang *et al.* (1993), o TGF- β , na concentração de 5ng/ml, estimulou o desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto. Adicionalmente, Marquant-Le *et al.* (1989) verificou que o TGF- β provocou aumento no número de células da MCI. O TGF- β adicionado simultaneamente com FGF, estimulou o ativação do genoma embrionário, resultando no aumento das taxas de blastocistos (LARSON *et al.* 1990; LARSON *et al.* 1992a). A combinação de TGF- β e EGF promoveu aumento da taxa de blastocistos eclodidos (KEEFER, 1992). Já com relação ao TGF- α , verificou-se um aumento no

crescimento e no desenvolvimento de embriões de 16-células e um estímulo ao processo de blastulação, tanto pela sua ação isolada como pela ação sinérgica com o FGF. (LARSON *et al.* 1992a).

O PDGF apresentou aumento no número de mórulas e blastocistos produzidos sendo que as proporções obtidas de mórulas são semelhantes àquelas com o uso do co-cultivo com células do oviduto (LARSON *et al.* 1992b; YANG *et al.* 1993; THIBODEAUX *et al.* 1993). PDGF combinado com o IGF-I, podem influenciar o início da expressão gênica embrionária, agindo sobre a etapa G₀ da 4ª divisão celular (estágio de 8 a 16 células), ativando protooncogenes que promovem a mitose dos blastômeros (LARSON *et al.* 1992b). É importante evidenciar também que, embriões expostos de forma prolongada ao PDGF, podem ter seu desenvolvimento inibido (LARSON *et al.* 1992b). Em ação conjunta com o TGF- β , Munson (1992) relatou que há sinergismo entre esses fatores para promover a proliferação das células trofoblásticas e endometriais, resultando numa melhor qualidade e implantação embrionária.

A fibronectina, por sua vez, é uma glicoproteína solúvel, constituinte da matriz extracelular, presente na superfície dos blastômeros. A fibronectina é secretada pelo ambiente materno e contribui para o desenvolvimento embrionário pré-implantacional. De acordo com Larson *et al.* (1992c) esta molécula fornece suporte para o desenvolvimento além do estágio de 8 a 16-células. No entanto, não fornece suporte aos processos de compactação e blastulação, apresentando taxas de blastocistos e de prenhez menores. Foram obtidas taxas de embriões de 8 a 16 células em proporções semelhantes àquelas produzidas pelo uso do co-cultivo com células do oviduto (EYESTONE e FIRST, 1989).

Embora estes fatores estimulam o desenvolvimento, é importante notar que resultam na formação de embriões em quantidade e qualidade inferiores, comparado àqueles produzidos através do co-cultivo ou meio condicionado, ou com o uso do soro. Isso se dá pela falta de moléculas essenciais ao progresso da proliferação e diferenciação celular. Outra característica importante desses fatores é que eles interagem entre si; portanto, deve-se considerar as relações entre as diferentes moléculas no meio de cultivo (THOMPSON, 2000).

2.2.4 MEIO SEQUENCIAL

Também conhecido como meio em duas-etapas, compreende a utilização de dois ou mais diferentes meios durante o período de cultivo. Com este sistema de cultivo busca-se suprir as diferentes necessidades fisiológicas dos embriões em seus diferentes estágios do desenvolvimento pré-implantacional, evitando assim o estresse intracelular (GARDNER e LANE, 1997). Este tipo de meio foi criado na tentativa de substituir meios simples como o MEM, os quais foram designados para o cultivo de células somáticas e não para embriões em estágio inicial de desenvolvimento (GARDNER e LANE, 1998; THOMPSON, 2000). Alguns autores consideram que o meio de duas-etapas utiliza o mesmo tipo de meio para as duas fases; no entanto, com as concentrações distintas de seus componentes, enquanto que o meio sequencial utiliza dois diferentes tipos de meios para as diferentes etapas (FELMER *et al.* 2011).

Um dos sistemas mais utilizados é o meio sequencial G1.2/G2.2, livre de soro e de células. Esse tipo de sistema sequencial é conhecido por proporcionar o desenvolvimento de blastocistos em altas taxas, não só na espécie bovina, mas em muitas outras, como na espécie humana, na qual é amplamente utilizado (LANE *et al.* 2003). Isso porque alcança taxas de produção de blastocisto semelhantes às aquelas com o uso de co-cultivo com células BRL, e um número maior de células nos blastocistos expandidos e também na MCI, devido a uma maior capacidade de diferenciação celular, comparado ao mesmo tipo de co-cultivo. Além do mais, diferentemente do que acontece no uso do soro, este tipo de meio sequencial fornece aumento nas taxas de criosobrevivência e nas taxas de prenhez, permitindo que este sistema de cultivo promova aumento tanto da qualidade como da viabilidade embrionária (LANE *et al.* 2003).

O meio G1/G2 apresenta alterações nas concentrações de carboidratos e de aminoácidos em dois meios: G1 e G2. O meio G1 tem sua concentração de carboidratos baseada na concentração encontradas no oviduto, com altas taxas de lactato e piruvato. Também contém aminoácidos não-essenciais e a glutamina que são reconhecidos por estimular a clivagem dos blastômeros, além de apresentar o EDTA, que promove a quelação de cátions divalentes, que são tóxicos para as células. Portanto, o meio G1 permite que ocorra assim a clivagem do embrião. Por outro lado, o meio G2 promove a blastulação e a diferenciação, apresentando a sua concentração de carboidratos baseada naquela encontrada no útero, com maiores proporções de

glicose, além de aminoácidos essenciais e não essenciais (GARDNER e LANE, 1998; THOMPSON, 2000). Nesta etapa, o EDTA não é presente. Ambos os meios apresentam soro em suas composições. Os resultados com esse tipo de meio têm sido promissores, permitindo obter blastocistos com número maior de células da MCI, e, assim, maiores taxas de implantação e de prenhez (GARDNER E LANE, 1998).

2.2.5 CO-CULTIVO COM CÉLULAS SOMÁTICAS

Na tentativa de aumentar a taxa de produção e a qualidade de embriões, além de suprimir a parada do desenvolvimento embrionário no estágio de 8 a 16 células (bloqueio do 4º ciclo celular), uma alternativa para a produção de embriões *in vitro* é o co-cultivo de embriões com células somáticas (REXROAD, 1989). Este tem sido o sistema de cultivo que apresenta as mais elevadas taxas de produção de embriões *in vitro* (cerca de 25% a 40% de blastocistos produzidos), embora ainda menores comparada às taxas de produção *in vivo* (cerca de 70%) (RIZOS *et al.* 2002). A fim de mimetizar as condições encontradas no trato reprodutivo feminino, os embriões estariam incluídos em um microambiente que simularia o ambiente materno, assegurando assim a sincronização entre o estágio de desenvolvimento em que se encontra o embrião e o seu local de desenvolvimento na estrutura reprodutiva da fêmea (GANDOLFI *et al.* 1993). São dois os principais tipos de co-cultivo: 1) em monocamada e 2) adição de células somáticas em concentrações definidas. E as células ou linhagens celulares utilizadas para o co-cultivo podem ser classificadas em três categorias: 1) células provenientes do trato reprodutivo, 2) células provenientes de tecidos não reprodutivos e 3) vesículas trofoblásticas (REHMAN *et al.* 2001).

Bavister (1992) estabeleceu duas funções principais das células somáticas durante o co-cultivo: 1) possuem a capacidade de secretar diversas substâncias importantes, como nutrientes, substratos, citosinas, fatores de crescimento, hormônios e até mesmo microRNAs (inclusos nas microvesículas exossomais), fornecendo assim fatores parácrinos importantes para o desenvolvimento, e 2) podem contribuir para a remoção de componentes tóxicos e ERO e para a inibição de enzimas supressoras do desenvolvimento. Assim, as células somáticas permitem a possibilidade de modulação do microambiente ao redor delas, seja por uma dessas funções apresentadas ou por ambas. Além disso, as células em co-cultivo são responsáveis por alterar a composição do meio onde os embriões se desenvolvem,

tanto pelo consumo da glicose como pela produção de lactato, ou ainda pela utilização dos antioxidantes, suportando, assim, o adequado desenvolvimento embrionário (BAVISTER, 1992).

É importante ressaltar que o número de passagens celulares durante o cultivo de uma determinada linhagem celular pode resultar em diferentes taxas de produção, dificultando a reprodutibilidade dentre os diferentes laboratórios e, conseqüentemente, a padronização da técnica (KRISHER *et al.* 1999).

São vários os tipos de células e linhagens celulares utilizadas para o co-cultivo de embriões: células da granulosa, células epiteliais do oviduto, células do *cumulus*, células BRL, células Vero, células-tronco mesenquimais, ou endometriais, fibroblastos uterinos, vesículas trofoblásticas. O uso do sistema de co-cultivo resulta em alta variação nas taxas de produção e características dos embriões, como é visto a seguir:

O co-cultivo com células da granulosa é o mais amplamente utilizado nos laboratórios de PIVE. Gera blastocistos de ótima qualidade tanto pelo cultivo em grupo como pelos cultivos isolados (GOOVAERTS *et al.* 2009).

As células BRL (do inglês: *buffalo rat liver*; BRL) promovem o desenvolvimento para além do estágio de 8 a 16 células, favorecendo a formação de blastocistos. Isso ocorre devido à capacidade dessas células em sobrepujar o bloqueio do 4º ciclo celular (DONNAY *et al.* 1997).

As células Vero cultivadas em monocamada, por sua vez, produzem altas taxas de blastocistos, através do estímulo ao desenvolvimento no estágio de clivagem e de mórula e estimulando, em menores proporções, o desenvolvimento posterior (HOSSEINI *et al.* 2008).

Efeitos benéficos do co-cultivo de células-tronco mesenquimais com embriões sobre o desenvolvimento embrionário têm sido evidenciados, especialmente com o uso de as células células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (MIRANDA *et al.* 2016). Neste caso, as taxas de produção obtidas foram maiores do que com o uso do meio pré-condicionado proveniente das mesmas células-tronco e até mesmo do que o co-cultivo com células da granulosa, células estas utilizadas tradicionalmente em sistemas de co-cultivo. Além desses resultados, o uso das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo no co-cultivo aumentou a qualidade dos embriões, uma vez que aumentou o número total de células e os níveis

de transcritos relacionados à pluripotência e ao metabolismo energético (MIRANDA *et al.* 2016).

2.2.6 MEIO CONDICIONADO

Adicionalmente, o uso de meios condicionados, produzidos pelos tipos celulares em co-cultivo, também evidencia o desenvolvimento benéfico de embriões (EYESTONE e FIRST 1989; KOBAYASHI *et al.* 1992; VANSTEENBRUGGE *et al.* 1994). Este meio de cultivo é tão efetivo quanto o co-cultivo para suportar o desenvolvimento de embriões, podendo ser adicionado a ele soro. Isso porque as substâncias presentes no meio condicionado também apresentam duas funções principais: são componentes embriotróficos, ou inibidores/supressores dos fatores tóxicos, como mencionado na seção do co-cultivo (BAVISTER, 1992).

O emprego do meio condicionado durante o cultivo permite investigar os mecanismos e as interações entre o embrião e as células somáticas. Este mesmo meio permite a identificação e o isolamento dos fatores secretados pelas células. Desta forma, permitiu-se, conseqüentemente, a inclusão desses fatores nos meios de cultivo quimicamente definidos, favorecendo assim a investigação das funções e das vias bioquímicas. Contudo, é importante ressaltar que o uso do soro no meio condicionado prejudica a identificação desses fatores embriotróficos (KOBAYASHI *et al.* 1992).

É importante ressaltar que as funções que as células apresentam durante o co-cultivo são influenciadas pelo meio condicionado utilizado para cultivá-las. Além disso, uma cultura primária difere, com relação à sua fisiologia, de uma linhagem já definida, sendo importante, portanto, evidenciar a escolha de um meio apropriado para cada uma delas. Atenta-se para o fato de que o uso de meio condicionado de células primárias apresenta desvantagens em relação ao meio condicionado de linhagens estabelecidas, isto devido à pequena quantidade de meio produzido e à alta variabilidade dentre os lotes que o meio condicionado das células primárias fornecem. Assim como no uso de células somáticas em co-cultivo, deve-se também atentar para o risco do ingresso de agentes infecciosos ao cultivo (VANSTEENBRUGGE *et al.* 1994).

Eyestone e First (1989) e Mermillod *et al.* (1993) demonstraram que o uso de meio condicionado de células do oviduto bovino (do inglês: *bovine oviduct conditioned*

medium; BOCM) em TCM 199 e com 10% de SFB forneceu altas taxas de produção de blastocistos, similares às aquelas encontradas nos sistemas de co-cultivo com as mesmas células. Sem a adição de SFB neste meio condicionado, as taxas de produção e o número de células/blastocisto diminuem quando comparados ao co-cultivo. Esses resultados remetem à propriedade que o soro apresenta em estimular o desenvolvimento dos embriões ao estágio de blastocisto, compensando, assim, a falha nutricional do BOCM (PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1991).

O meio condicionado de células da granulosa bovina (do inglês: *bovine granulosa cell conditioned medium*; BGCCM) promove a formação de blastocisto em proporções semelhantes às aquelas com o co-cultivo com as mesmas células e suplementado com soro. No entanto, o número total de células por blastocisto é menor no meio condicionado do que no co-cultivo, podendo indicar uma menor qualidade e viabilidade embrionária dos embriões gerados no BGCCM (KOBAYASHI *et al.* 1992).

Vansteenbrugge *et al.* (1994) demonstrou que o meio condicionado das células de BRL (do inglês: *buffalo rat liverl conditioned medium*; BRLCM) proporcionou maior proliferação celular, como evidenciado pelo nº total de células maior do que o BOCM, indicando que os embriões cultivados em BRLCM apresentam maior viabilidade do que aqueles cultivados em BOCM.

2.3 CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE O CULTIVO

2.3.1 PRESSÃO GASOSA

A PIVE requer temperatura e pressão atmosférica adequadas para o crescimento embrionário. Para isso, utilizam-se as incubadoras, ou estufas, que mantêm sobre controle as concentrações de gases como oxigênio, nitrogênio e gás carbônico (O₂, N₂ e CO₂, respectivamente) e da temperatura.

Analisando a fisiologia do microambiente materno, onde o pré-desenvolvimento embrionário ocorre, sabe-se que no oviduto e no útero, a concentração atmosférica do gás oxigênio varia de 1,5% a 9%, sendo, dentro deste nível, maior no oviduto do que no útero. No entanto, na maioria dos laboratórios de PIVE, a tensão utilizada é a atmosférica, que apresenta cerca de 20 a 21% de O₂, uma condição

consideravelmente mais alta que a tensão do lúmen do trato reprodutivo da fêmea (FISCHER e BAVISTER, 1993).

Na tentativa de proporcionar concentração fisiológica de O₂, muitos estudos têm demonstrado que a redução na tensão atmosférica do O₂ para 5% está associada com maiores taxas de blastocistos e blastocistos eclodidos, comparado às taxas obtidas sob concentração atmosférica (cerca de 20-21% de O₂) (THOMPSON *et al.* 1990; KHURANA e NIEMANN, 2000). Isso pode estar relacionado às diferentes condições metabólicas durante os estágios de desenvolvimento do embrião. Por exemplo, durante o período pré-compactação (estágio de clivagem), os embriões realizam preferencialmente a fosforilação oxidativa para a geração de ATP, por meio do consumo de piruvato e do aminoácido glutamina, utilizando O₂ na cadeia da mitocôndria. Já o período pós-compactação é marcado pela via glicolítica, na qual demanda elevada utilização de glicose, e menor demanda de O₂, beneficiando-se da condição de 5% de O₂, gerando assim maior proporção de blastocistos e blastocistos eclodidos (THOMPSON, 1996).

Sabe-se também que o O₂ está envolvido na geração das ERO. Estes, por sua vez, são prejudiciais ao desenvolvimento, com vários efeitos deletérios, como: (i) danos ao DNA, (ii) peroxidação lipídica, que pode alterar a permeabilidade das membranas celulares e (iii) a oxidação de proteínas, afetando a sua funcionalidade (GUERIN *et al.* 2001). Embriões cultivados sob alta tensão de O₂ podem, portanto, ter seu desenvolvimento prejudicado, atribuindo a essa condição uma maior produção de radicais livres (LONERGAN *et al.* 1994). No entanto, essa condição pode ser revertida pela adição de antioxidantes como a vitamina E, GSH e SOD, responsáveis por metabolizar e diminuir a concentração dos ERO (OLSON e SEIDEL, 2000; LUVONI *et al.* 1996).

Adicionalmente, sabe-se que a presença de células somáticas, em co-cultivo, influencia a escolha da atmosfera a ser aplicada. Na maioria das vezes, a concentração escolhida é a atmosférica. Isso se deve ao fato de que as células somáticas fornecem ao meio, ao qual os embriões se encontram, um ambiente de baixa tensão gasosa (FUKUI *et al.* 1991). Além disso, as células somáticas são reconhecidas por diminuir as concentrações de ERO, principalmente de ânions superóxido (O₂⁻) (GOOVAERTS *et al.* 2009).

Outro aspecto importante é que o processo de difusão gasosa pode ser influenciado pelo tamanho do embrião, o qual, por sua vez, é determinado pelo estágio de desenvolvimento de mesmo. A difusão gasosa pode ser dificultada nos estágios mais tardios do desenvolvimento pré-implantacional, principalmente para as células mais interiorizadas, como as da MCI, podendo levá-las a uma condição de hipóxia. Sugere-se que a hipóxia induzida pode estar associada a alteração da transcrição de RNAs mensageiros (RNAm) de fatores de crescimento e daqueles ligados à apoptose. Alterações da expressão gênica nestes casos, indicam, por conseguinte, estresse celular oxidativo, conforme mencionado anteriormente (THOMPSON, 1996).

Os embriões produzidos sob baixa pressão apresentam mais células apoptóticas e fragmentações celulares do que embriões cultivados em alta pressão (RHO *et al.* 2007).

2.3.2 TEMPERATURA

Há poucas informações sobre as condições de temperatura sobre o desenvolvimento do embrião. Define-se que a temperatura ótima para o desenvolvimento é em torno de 39° C (THOMPSON, 1996). Um estudo tem demonstrado que o desenvolvimento de embriões *in vitro* em torno de 36 a 40°C gera mais blastocistos e blastocistos expandidos do que na temperatura de 39°C (WANG, 1991).

2.3.3 CULTIVO EM GRUPO E CULTIVO ISOLADO

O número de embriões por unidade de cultivo pode levar à classificação de dois tipos principais de cultivo: cultivo isolado e cultivo em grupo. Dentro de cada uma dessas duas condições, pode-se demarcar o volume a ser utilizado/ocupado por cada embrião. Assim, tem-se necessário a definição da densidade embrionária que é razão entre o número de embriões e a unidade de volume (geralmente em μL , decorrente do pequeno volume das gotas de cultivo). Sabe-se que no útero, o embrião é circundado por menos de 1 μL de fluido. A partir destes conceitos e desta informação estabelece-se que o volume ideal para o cultivo *in vitro* de um único embrião é cerca de 1 μL . Cultivos em grupo, portanto, necessitam de um volume maior.

O cultivo de embriões, sejam em grupos ou individuais, podem ser de duas formas: em grande volume (ou de alta DE), ou em pequeno volume (ou de baixa DE). Para cultivos individuais, o volume varia entre 1 e 500 μ L. O volume das gotas de cultivo em grupos, por sua vez, depende do número de embriões a elas adicionadas.

Tem-se alcançado altas taxas de blastocistos quando se realiza o cultivo em grupo, ou quando aumenta-se o número de embriões por unidade de volume, isto é, quando a densidade embrionária é alta (GARDNER *et al.* 1994; KEFFER *et al.* 1994; KHURANA e NIEMANN, 2000). Sabe-se que os embriões secretam fatores autócrinos e/ou parácrinos, os quais são responsáveis por estimular o crescimento (WATSON *et al.* 1992). Uma menor densidade embrionária, geralmente verificada em condições de cultivo individual, levariam a uma maior diluição dos fatores secretados, e, portanto, a uma menor probabilidade de ação dessas moléculas. Portanto, pode-se dizer que as condições de cultivo em grupo mantêm os fatores embriotróficos em suas concentrações funcionais (KHURANA e NIEMANN, 2000). São evidenciados menores números de células, menores taxas de blastocistos eclodidos, maior quantidade de células apoptóticas e menor criotolerância nos embriões cultivados isoladamente, se comparados em grupo (GOOVAERTS *et al.* 2009).

É importante salientar que as condições de alta densidade celular, não apenas de embriões, mas juntamente com as células somáticas em co-cultivo, fornecem também altas taxas de produção de blastocistos, uma vez que verifica-se similarmente a presença dos fatores embriotróficos neste sistema de cultivo. Assim, é relevante considerar a diluição desses fatores no meio de cultivo, ressaltando, desta forma, a ideia de uso de volume de meio adequado (DONNAY *et al.* 1997).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários são os sistemas e as condições de cultivo *in vitro* de embriões bovinos que permitem o suporte ao desenvolvimento embrionário pré-implantacional. Os mais utilizados são o sistema de co-cultivo com células somáticas e a utilização de meios contendo soro devido às taxas de produção de blastocistos em níveis consistentes, comparado aos demais sistemas de cultivo *in vitro*. Todavia os sistemas quimicamente definidos tem sido uma alternativa para o a PIVE bovina, uma vez que permitem a determinação das funções das moléculas a ele adicionadas e de suas reações bioquímicas. Por isso, este tipo de meio possui grande importância na pesquisa básica no que se refere aos conhecimentos da fisiologia reprodutiva animal. Adicionalmente, vale ressaltar que os padrões fisiológicos de desenvolvimento embrionário são semelhantes entre os mamíferos, indicando possíveis contribuições do modelo animal bovino ao estudo da fisiologia reprodutiva humana. A continuidade destas investigações deve dedicar-se a aprimorar a qualidade e a produção embrionária, utilizando para isso, simular às condições do ambiente materno.

4. REFERÊNCIAS

ABE, Hiroyuki et al. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and-fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular reproduction and development*, v. 53, n. 3, p. 325-335, 1999.

BARNES, F. L.; EYESTONE, W. H. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology*, v. 33, n. 1, p. 141-152, 1990.

BAVISTER, Barry D. Co-culture for embryo development: is it really necessary?. *Human Reproduction*, v. 7, n. 10, p. 1339-1341, 1992.

BAVISTER, Barry D.; ROSE-HELLEKANT, Teresa A.; PINYOPUMMINTR, Tanu. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, v. 37, n. 1, p. 127-146, 1992.

BAVISTER, Barry D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human reproduction update*, v. 1, n. 2, p. 91-148, 1995.

BYRNE, A. T. et al. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Molecular Reproduction and Development*, v. 62, n. 4, p. 489-495, 2002.

CAMOUS, Sylvaine et al. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *Journal of reproduction and fertility*, v. 72, n. 2, p. 479-485, 1984.

CAROLAN, C. et al. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, v. 43, n. 6, p. 1115-1128, 1995.

DONNAY, Isabelle et al. Effects of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 47, n. 8, p. 1549-1561, 1997.

ECKERT, J.; NIEMANN, H. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology*, v. 43, n. 7, p. 1211-1225, 1995.

EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 85, n. 2, p. 715-720, 1989.

FELMER, R. N. et al. Effect of different sequential and two-step culture systems on the development, quality, and RNA expression profile of bovine blastocysts produced in vitro. *Molecular reproduction and development*, v. 78, n. 6, p. 403-414, 2011.

FISCHER, B.; BAVISTER, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of reproduction and fertility*, v. 99, n. 2, p. 673-679, 1993.

FLOOD, et al. Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development in vitro. *Theriogenology*, v. 39, n. 4, p. 823-833, 1993.

FUKUI, Y. et al. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of reproduction and fertility*, v. 92, n. 1, p. 125-131, 1991.

GANDOLFI, F. et al. Role of the oviduct during early embryogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 28, n. 3, p. 189-192, 1993.

GARDNER, David K. et al. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biology of reproduction*, v. 50, n. 2, p. 390-400, 1994.

GARDNER, David K.; LANE, Michelle. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF?. Human reproduction update, v. 3, n. 4, p. 367-382, 1997.

GARDNER, David K.; LANE, Michelle. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. Human reproduction, v. 13, n. suppl_3, p. 148-159, 1998.

GOOVAERTS, I. G. F. et al. Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. Theriogenology, v. 71, n. 5, p. 729-738, 2009.

GUERIN, et al. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Human reproduction update, v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.

HEYNER, S. et al. The role of growth factors in embryo production. Theriogenology, v. 39, n. 1, p. 151-161, 1993.

HILL, David J. Growth factors and their cellular actions. Journal of reproduction and fertility, v. 85, n. 2, p. 723-734, 1989.

HOSSEINI, Sayyed Morteza et al. Highly efficient in vitro production of bovine blastocyst in cell-free sequential synthetic oviductal fluid vs. TCM 199 Vero cell co-culture system. IJFS, v. 2, p. 66-73, 2008.

KEEFER, C. L. Development of in vitro produced bovine embryos cultured individually in a simple medium: Effects of EGF and TGF β 1. Theriogenology, v. 37, n. 1, p. 236, 1992.

KESKINTEPE, Levent; BRACKETT, Benjamin G. In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biology of Reproduction*, v. 55, n. 2, p. 333-339, 1996.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 54, n. 5, p. 741-756, 2000.

KIM, J. H. et al. Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology*, v. 39, n. 4, p. 875-886, 1993.

KRISHER, Rebecca L.; LANE, Michelle; BAVISTER, Barry D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of reproduction*, v. 60, n. 6, p. 1345-1352, 1999.

LANE, Michelle et al. Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. *Molecular reproduction and development*, v. 64, n. 1, p. 70-78, 2003.

KOBAYASHI, Keizo et al. Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in serum-free conditioned medium from bovine granulosa cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, v. 28, n. 4, p. 255-259, 1992.

LANGENDONCKT, Anne Van et al. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *Journal of reproduction and fertility*, v. 109, n. 1, p. 87-93, 1997.

LARSON, R. C. et al. Defined medium containing TGF β and bFGF permits development of bovine embryos beyond the "8-cell block". *Reprod. Fert. Abstr. Ser.*, n. 5, 1990.

LARSON, R. C. et al. Transforming growth factor β and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. *Molecular reproduction and development*, v. 33, n. 4, p. 432-435, 1992a.

LARSON, R. C. et al. Platelet derived growth factor (PDGF) stimulates development of bovine embryos during the fourth cell cycle. *Development*, v. 115, n. 3, p. 821-826, 1992b.

LARSON, R. C. et al. Effect of fibronectin on early embryo development in cows. *Journal of reproduction and fertility*, v. 96, n. 1, p. 289-297, 1992c.

LEE, E. S.; FUKUI, Y. Effect of various growth factors in a defined culture medium on in vitro development of bovine embryos matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, v. 44, n. 1, p. 71-83, 1995.

LIM, J. M. et al. Effects of fetal calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, v. 41, n. 5, p. 1091-1098, 1994.

LONERGAN, P.; et al. Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. *Reproduction Nutrition Development*, v. 34, n. 4, p. 329-339, 1994.

LONERGAN, P. et al. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biology of reproduction*, v. 54, n. 6, p. 1420-1429, 1996.

LONERGAN, P. et al. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *Journal of reproduction and fertility*, v. 117, n. 1, p. 159-167, 1999a.

LONERGAN, P. et al. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology*, v. 51, n. 8, p. 1565-1576, 1999b.

LUVONI, Gaia C. et al. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Molecular reproduction and development*, v. 43, n. 4, p. 437-443, 1996.

MATSUI, Motozumi et al. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized in vitro. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 57, n. 6, p. 1109-1111, 1995.

MÉNÉZO, Y. J. R.; VEIGA, A.; POULY, J. L. Assisted reproductive technology (ART) in humans: facts and uncertainties. *Theriogenology*, v. 53, n. 2, p. 599-610, 2000.

MERMILLOD, P. et al. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biology of reproduction*, v. 49, n. 3, p. 582-587, 1993.

MIRANDA, Moysés S. et al. Increasing of blastocyst rate and gene expression in co-culture of bovine embryos with adult adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of assisted reproduction and genetics*, v. 33, n. 10, p. 1395-1403, 2016.

MUNSON, L. L. Transforming growth factor- β and platelet-derived growth factor are synergistic mitogens for bovine trophoblastic and endometrial epithelial cells. *Biol Reprod*, v. 46, n. 1, p. 67, 1992.

OLSON, S. E.; SEIDEL JR, G. E. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 2, p. 248-252, 2000.

PINYOPUMMINTR, Tanu; BAVISTER, Barry D. In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biology of reproduction*, v. 45, n. 5, p. 736-742, 1991.

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

REHMAN, N. U.; SARWAR, M.; SAMAD, H. A. In vitro production of bovine embryos- A review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*, v. 14, n. 9, p. 1342-1351, 2001.

REXROAD, Caird E. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, v. 31, n. 1, p. 105-114, 1989.

RHO, Gyu-Jin et al. Influence of in vitro oxygen concentrations on preimplantation embryo development, gene expression and production of Hanwoo calves following embryo transfer. *Molecular reproduction and development*, v. 74, n. 4, p. 486-496, 2007.

RIZOS, Dimitrios et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development*, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.

RIZOS, D. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of reproduction*, v. 68, n. 1, p. 236-243, 2003.

SENGER, P. L. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Current Conceptions, Inc. Segunda edição, p. 284-96, 2003.

SIRISATHIEN, S. et al. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. *Animal reproduction science*, v. 77, n. 1, p. 21-32, 2003.

TAKAGI, Y. et al. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. *Theriogenology*, v. 35, n. 6, p. 1197-1207, 1991.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N. L. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, v. 37, n. 5, p. 963-978, 1992.

THIBODEAUX, et al. Role of platelet-derived growth factor in development of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. *Journal of reproduction and fertility*, v. 98, n. 1, p. 61-66, 1993.

THOMPSON, J. G. E. et al. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *Journal of reproduction and fertility*, v. 89, n. 2, p. 573-578, 1990.

THOMPSON, Jeremy G. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, v. 45, n. 1, p. 27-40, 1996.

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

VANSTEENBRUGGE, A. et al. In vitro development of bovine embryos in buffalo rat liver-or bovine oviduct-conditioned medium. *Theriogenology*, v. 42, n. 6, p. 931-940, 1994.

WALKER, S. K. et al. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology*, v. 45, n. 1, p. 111-120, 1996.

WANG, W. L. The effect of temperature on the in vitro maturation fertilization and development of bovine oocytes. *Proc. 7th Scientific Meet. Euro. Embryo Transfer Assoc.*, 1991, 1991.

WATSON, Andrew J. et al. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Molecular reproduction and development*, v. 31, n. 2, p. 87-95, 1992.

WOOD, S. A.; KAYE, P. L. Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. *Journal of reproduction and fertility*, v. 85, n. 2, p. 575-582, 1989.

WRENZYCKI, C. et al. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Human Reproduction*, v. 16, n. 5, p. 893-901, 2001.

YANG, B. K.; YANG, X.; FOOTE, R. H. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of in vitro matured and in vitro fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 40, n. 3, p. 521-530, 1993.