

Co-cultivo de zigotos e embriões de duas células de camundongos (*Mus musculus domesticus*) em suspensão de células epiteliais de ovidutos de camundongos e bovinos nos meios CZB sem glicose, TCM199 e Ménézo B₂

CORRESPONDÊNCIA PARA:
José Antonio Visintin
Departamento de Reprodução Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP
Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira
Av. Orlando Marques de Paiva, 87,
05508-000 - São Paulo - SP
e-mail: visintin@usp.br

Zygotes and two cells mouse embryos in co-culture of mouse and bovine epithelial cells in CZB glucose free, TCM199 and Ménézo B₂ mediuns

1-Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP-SP
2-Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP-SP

Liliam Mara Trerrisan TAVARES¹; Mayra Elena Ortiz D'Avila ASSUMPÇÃO¹; Fernando FERREIRA²; Alecsandra Sobreira LIMA¹; Marco Roberto Bourg MELLO¹; José Antonio VISINTIN¹

RESUMO

Zigotos e embriões de 2 células de camundongos F1 (C57/DBA) foram cultivados (controle) e co-cultivados em suspensões de células epiteliais de ovidutos de camundongos (MOEC) e de bovinos (BOEC) até o estágio de blastocistos nos meios CZB, TCM199 e Ménézo B₂. Os zigotos que atingiram os estádios de blastocistos expandido e eclodido no CZB foram 44 (38,26%) para o controle, 2 (1,89%) para as MOEC e 8 (6,72%) para as BOEC, sendo que o controle apresentou-se estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) em relação às MOEC e às BOEC. Os zigotos cultivados e co-cultivados nos meios TCM199 e B₂ não clivaram além de 2 células. Os embriões de 2 células que desenvolveram até blastocistos no CZB foram 46 (43,80%) para o controle, 45 (38,79%) para as MOEC e 37 (29,60%) para as BOEC, sendo que o controle apresentou-se estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) em relação às BOEC. No TCM199, o total de blastocistos foi de 52 (48,15%) para o controle, 68 (39,08%) para as MOEC e 64 (48,49%) para as BOEC, não havendo diferença estatística ($p > 0,05$) entre os três grupos. No B₂, o total de blastocistos foi de 28 (24,78%) para o controle, 34 (28,10%) para as MOEC e 25 (23,81%) para as BOEC, não havendo diferença estatística ($p > 0,05$) entre os três grupos. Concluiu-se que o bloqueio dos zigotos nos meios TCM199 e B₂ pode estar relacionado à presença da glicose e que o oviduto não é espécie-específico quanto a sua capacidade em promover o desenvolvimento de embriões de camundongos.

UNITERMOS: Cultivos celulares; Células epiteliais; Embriões; Camundongos.

INTRODUÇÃO

Quando se cultivam embriões *in vitro*, ocorre o chamado "bloqueio celular" na fase de 2 células em camundongos e na fase de 8 células em bovinos². Estudos sobre o bloqueio celular mostram que esta fase coincide com as modificações na síntese de mRNA, sugerindo que em camundongos, até o final do estágio de 2 células, o embrião está sob controle materno e que o cultivo *in vitro* induz a deficiências citoplasmáticas que não permitem o seu

desenvolvimento até o estágio de blastocisto¹³. Sabe-se que *in vivo* vários processos são responsáveis pelo desenvolvimento, como, por exemplo, as mudanças na síntese protéica após a fecundação. Em camundongos, da fase de zigoto até 8 células, ocorrem alterações nas proteínas sintetizadas a partir do mRNA materno, degradação do mRNA e aumento do mRNA embrionário¹⁶. Para que estas modificações ocorram, fatores autócrinos e parácrinos atuam sobre o embrião durante o seu desenvolvimento, como os fatores de crescimento do embrião e do fluido do oviduto, as

proteínas específicas sintetizadas pelas células epiteliais do oviduto e os demais componentes do fluido do oviduto, como os íons, o lactato e o piruvato, interagindo intensa e delicadamente com o embrião, possibilitando o seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto⁹.

Para minimizar o bloqueio celular durante o cultivo *in vitro*, vêm sendo utilizados sistemas de co-cultivo com células epiteliais de oviduto ou com células estabelecidas ou meios condicionados, demonstrando a não-especificidade do oviduto sobre o desenvolvimento embrionário^{20,25,38}. É sabido que o fluido do oviduto é constituído de várias substâncias derivadas do plasma sanguíneo e de proteínas específicas secretadas pelas células do oviduto²³, sendo que uma proteína de baixo peso molecular (<46KDa), provavelmente sintetizada pelo oviduto, é importante nas primeiras clivagens dos embriões de camundongos²⁶.

Diante dos resultados controversos em relação à especificidade celular para o co-cultivo de embriões e das dificuldades no desenvolvimento *in vitro* de embriões de camundongos de linhagens que apresentam bloqueio no estágio de duas células, o presente estudo dirigiu-se para a produção de células epiteliais de ovidutos de camundongos e bovinos em suspensão e para o co-cultivo de zigotos e embriões de 2 células de camundongos em suspensões celulares até o estágio de blastocisto.

MATERIAL E MÉTODO

Cultivo de células epiteliais de ovidutos de camundongos

Foram utilizadas fêmeas F1 C57Bl/DBA, entre 6 e 8

semanas de idade, mantidas à temperatura de 22°C, 55% de umidade, renovação de ar controlada, 14 horas luz e com água e ração *ad libitum*. As camundongas foram superovuladas com 5 UI de eCG (Intervet) e, após 48 horas, 5 UI de hCG (Intervet), sendo acasaladas com machos vasectomizados. Após 24 horas da aplicação do hCG, as fêmeas foram sacrificadas por deslocamento cervical e aberta a cavidade abdominal para retirada dos ovidutos, os quais foram colocados em placa de Petri (Costar) de 35 mm contendo Solução Salina Tamponada (PBS - Nutricell) acrescida de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB - Nutricell). Os ovidutos foram mantidos no meio Tissue Culture Medium 199 (TCM199 - Gibco) acrescido de 0,05% de pronase (Sigma) por 90 minutos à temperatura de 37°C em estufa com 5% de CO₂³⁶. Após este período, a solução de TCM199 foi transferida para um tubo cônico (Costar) de 15 ml, onde permaneceu por 10 minutos para sedimentar as células, quando foi descartado o sobrenadante. Este processo foi repetido por duas vezes nos meios de cultivo Chatot, Ziomek e Bavister (CZB) acrescidos de 4 mg de BSA fração V (Sigma) por ml ou TCM199 e Mézénó B₂ (B₂ - INRA) acrescidos de 10% de SFB. Em seguida, cada sedimento foi ressuspenso em 1 ml do respectivo meio, colocando-se 250 µl em uma placa de Petri de 35 mm contendo 2,5 ml do próprio meio de cultivo. As células foram cultivadas em estufa com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C durante 8 dias (controle), realizando-se a troca dos meios CZB, TCM199 e B₂ após 48 horas do início do cultivo e nas avaliações a cada 48 horas. Ainda, foi efetuado o cultivo em suspensão, colocando-se de 4 a 6 pequenos

Tabela 1

Desenvolvimento de embriões de 2 células de camundongos nos meios CZB, TCM199 e B₂ com e sem células epiteliais de ovidutos de camundongos (MOEC) e de bovinos (BOEC), São Paulo - 1997.

Meios de Cultivo	D-1	D-2	D-4		D-5
	Zigoto (n)	2 células (%)	Bloqueado	Não Bloqueado	Blastocisto
			2-4 células (%)	Mo + Bl (%)	Exp + Ecl (%)
CZB (controle)	115	115 (100)	31 (26,96) ^a	84 (73,04) ^a	44 (38,26) ^a
CZB + MOEC	106	106 (100)	15 (14,15) ^b	91 (85,85) ^b	2 (1,89) ^b
CZB + BOEC	119	119 (100)	62 (52,10) ^c	57 (47,90) ^c	8 (6,72) ^b
TCM199 (controle)	119	119 (100)	119 (100)		
TCM199 + MOEC	126	126 (100)	126 (100)		
TCM199 + BOEC	115	115 (100)	115 (100)		
B2 (controle)	142	142 (100)	142 (100)		
B2 + MOEC	140	140 (100)	140 (100)		
B2 + BOEC	161		161 (100)		

CZB sem glicose + 4mg de BSA-V por ml

TCM199 e B₂ + 10% SFB

D1 - Colheita dos zigotos (24 horas após a aplicação do hCG)

D2, D4 e D5 - Avaliações dos embriões (24, 72 e 96 horas após o início do co-cultivo)

Mo = Mórula

Bl = Blastocisto

Exp = Expandido

Ecl = Ecldido

Tabela 2

Desenvolvimento de embriões de 2 células de camundongos nos meios CZB, TCM199 e B₂ com e sem células epiteliais de ovidutos de camundongos (MOEC) e de bovinos (BOEC), São Paulo - 1997.

Meios de Cultivo	D-2		D-4		D-5
	2 células (n)	Bloqueado	Não Bloqueado		Blastocisto
		2-4 células (%)	Mo + BI (%)		Exp + Ecl (%)
CZB (controle)	105	19 (18,10)	86 (81,90)		46 (43,80) ^a
CZB + MOEC	116	21 (18,10)	95 (81,90)		45 (38,79) ^{ab}
CZB + BOEC	125	14 (11,20)	111 (88,80)		37 (29,60) ^b
TCM199 (controle)	108	45 (41,67) ^a	63 (58,33) ^a		52 (48,15)
TCM199 + MOEC	174	83 (47,70) ^a	91 (52,30) ^a		68 (39,08)
TCM199+ BOEC	132	37 (28,03) ^b	95 (71,97) ^b		64 (48,49)
B2 (controle)	113	74 (65,49) ^a	39 (34,51) ^a		28 (24,78)
B2 + MOEC	121	71 (58,68) ^{ab}	50 (41,32) ^{ab}		34 (28,10)
B2 + BOEC	105	48 (45,71) ^b	57 (54,29) ^b		25 (23,81)

CZB sem glicose + 4 mg de BSA-V por ml TCM199 e B₂ + 10% SFB

D2 - Colheita dos embriões de 2 células (48 horas após a aplicação do hCG)

D4 e D5 - Avaliações dos embriões (48 e 72 horas após o início do co-cultivo)

Colunas com letras desiguais em cada grupo são estatisticamente diferentes

Mo = Mórula

BI = Blastocisto

Exp = Expandido

Ecl = Eclodido

Tabela 3

Cultivo (controle) e co-cultivo de embriões de 2 células de camundongos com células epiteliais de ovidutos de camundongos (MOEC) e de bovinos (BOEC), nos meios CZB, TCM199 e B₂. São Paulo - 1997.

Células/Meios de Cultivo	D-2		D-4		D-5
	2 células (n)	Bloqueado	Não Bloqueado		Blastocisto
		2-4 células (%)	Mo + BI (%)		Exp + Ecl (%)
CONTROLE (CZB)	105	19 (18,10) ^a	86 (81,90) ^a		46 (43,80) ^a
CONTROLE (TCM199)	108	45 (41,67) ^b	63 (58,33) ^b		52 (48,15) ^a
CONTROLE (B2)	113	74 (65,49) ^c	39 (34,51) ^c		28 (24,78) ^b
MOEC (CZB)	116	21 (18,10) ^a	95 (81,90) ^a		45 (38,79)
MOEC (TCM199)	174	83 (47,70) ^b	91 (52,30) ^b		68 (39,08)
MOEC (B2)	121	71 (58,68) ^b	50 (41,32) ^b		34 (28,10)
BOEC (CZB)	125	14 (11,20) ^a	111 (88,80) ^a		37 (29,60) ^a
BOEC (TCM199)	132	37 (28,03) ^b	95 (71,97) ^b		64 (48,49) ^b
BOEC (B2)	105	48 (45,71) ^c	57 (54,29) ^c		25 (23,81) ^a

CZB sem glicose + 4 mg de BSA-V por ml TCM199 + B₂ + 10% SFB

D2 - Colheita dos embriões de 2 células (48 horas após a aplicação do hCG)

D4 e D5 - Avaliações dos embriões (48 e 72 horas após o início do co-cultivo)

Colunas com letras desiguais em cada grupo são estatisticamente diferentes

Mo = Mórula

BI = Blastocisto

Exp = Expandido

Ecl = Eclodido

aglomerados de células por gota de 100 µl dos meios CZB, TCM199 ou B₂, sob óleo mineral (Sigma) em placa de Petri (Costar) de 60 mm. Após 3 lavagens nos respectivos meios, os zigotos e os embriões de 2 células de camundongos foram colocados em co-cultivos.

Cultivo de células epiteliais de ovidutos de bovinos

Os ovidutos foram colhidos até 15 minutos após o abate das fêmeas, lavados 2 vezes em solução fisiológica 0,9%

adicionada de 100 UI de penicilina G (Sigma) por ml e em seguida transportados nesta solução a 29°C. No laboratório, os ovidutos foram lavados em solução fisiológica 0,9% e dissecados, sendo sob fluxo laminar, lavados externamente com álcool 70°GL e ainda, externa e internamente, com solução de PBS acrescida de 10% de SFB e 100 UI de Penicilina G e 50 mg de Estreptomicina (Sigma) por ml. O oviduto foi comprimido levemente e injetado em sua luz 2 ml de PBS, recuperando-se as células epiteliais em um tubo cônico de 15 ml, onde foram sedimentadas durante 10 minutos⁸. Em seguida, realizaram-se duas

lavagens em PBS e duas nos meios CZB acrescidos de 4 mg de BSA fração V por ml ou TCM199 e B₂ acrescidos de 10% SFB. Após a última lavagem, cada sedimento foi ressuscitado em 1 ml do respectivo meio, procedendo-se ao cultivo celular como mencionado no item 3.1.

Co-cultivo de zigotos e de embriões de 2 células de camundongos em suspensões de células epiteliais de ovidutos de camundongos e de bovinos

Os embriões de camundongos foram colhidos em estádios de zigoto e de 2 células, de fêmeas F1 C57Bl/DBA, púberes entre 6 e 8 semanas de vida, superovuladas com 5 UI de eCG e, após 48 horas, 5 UI de hCG, via intraperitoneal, sendo acasaladas com machos inteiros da mesma linhagem. Após 26 a 28 e 40 a 42 horas da injeção de hCG, foram efetuadas as colheitas dos zigotos e dos embriões de 2 células, respectivamente. Para a colheita dos zigotos e dos embriões de 2 células, as fêmeas foram sacrificadas, os ovidutos retirados e transferidos para placa de Petri de 35 mm contendo solução de PBS acrescida de 10% de SFB. A colheita dos zigotos e dos embriões de 2 células foi realizada com auxílio de seringa de 1 ml e agulha gengival 30G (B&D) sob fluxo laminar. Após cada colheita, 15 a 20 zigotos ou embriões de 2 células foram colocados no co-cultivo em suspensão de células de ovidutos de camundongos ou de bovinos, em gota de 100 µl de CZB acrescido de 4 mg de BSA-V por ml ou TCM199 e B₂ acrescidos de 10% de SFB, sob óleo mineral em placa de Petri de 60 mm.

Como controle, foram cultivados zigotos e embriões de 2 células nos meios CZB, TCM199 e B₂ sem células, em gota de 100 µl sob óleo mineral.

Os sistemas de cultivo e de co-cultivo dos zigotos foram avaliados às 24, 72 e 96 horas e dos embriões de 2 células às 48 e 72 horas após o início do cultivo.

Análise estatística

Com o objetivo de comparar a proporção de desenvolvimento embrionário, utilizou-se o teste Qui-quadrado (χ^2) com nível de significância α 95% ($\alpha < 0,05$). Em situações em que os valores empregados foram menores que 5, utilizou-se o teste de Fisher³. Todos os cálculos estatísticos foram efetuados pelo programa Epi Info Executive Health Information Shell 1.03.08/3/95, idealizado por Coulombier D.*; Faran, R.*; Halthock, L.**; e Smith, C.*.

RESULTADOS

No experimento de cultivo e de co-cultivo de zigotos (Tab.1) no CZB (zigoto x CZB), os resultados demonstraram que 100% dos embriões, no segundo dia (D-2), atingiram o estágio de duas células nos grupos CONTROLE, MOEC e BOEC. No

quarto dia (D-4), os embriões bloqueados e não-bloqueados (mórulas e blastocistos) apresentaram-se estatisticamente diferentes entre os grupos CONTROLE, BOEC e MOEC ($p \leq 0,05$), enquanto no quinto dia (D-5) o grupo CONTROLE apresentou-se estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) em relação aos grupos MOEC e BOEC quanto aos blastocistos expandido e eclodido.

Nos experimentos com os meios TCM199 e B₂, houve bloqueio de desenvolvimento de 100% dos embriões após a primeira clivagem (Tab. 1).

Colunas com letras desiguais são estatisticamente diferentes. No experimento de cultivo e de co-cultivo de embriões de 2 células (Tab. 2) no CZB (2 células x CZB), no D-4, tanto os embriões bloqueados quanto os não-bloqueados (mórulas e blastocistos) não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os grupos CONTROLE, MOEC e BOEC. No D-5, os embriões em estádios de blastocistos expandido e eclodido cultivados no grupo CONTROLE apresentaram-se estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) em comparação aos co-cultivados no grupo BOEC.

No experimento de cultivo e de co-cultivo de embriões de 2 células (Tab. 2) no TCM199 (2 células X TCM199), no D-4, tanto os embriões bloqueados quanto os não-bloqueados (mórulas e blastocistos) no grupo BOEC apresentaram-se estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) quando comparados aos grupos CONTROLE e MOEC. Já para o B₂ (2 células X B₂), observou diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os grupos BOEC e CONTROLE. No D-5, tanto no B₂ quanto no TCM199, os blastocistos expandido e eclodido nos grupos CONTROLE, MOEC e BOEC não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

Comparando-se o desenvolvimento dos embriões de 2 células nos grupos CONTROLE e BOEC (Tab. 3), no D-4, verificaram-se que tanto os embriões bloqueados quanto os não-bloqueados (mórula e de blastocisto) apresentaram-se estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) entre os meios CZB, TCM199 e B₂. Já para a MOEC, observou-se que houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre o CZB e os meios TCM199 e B₂. No D-5, verificou-se que houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) em relação aos blastocistos no grupo CONTROLE entre o meio B₂ e os meios CZB e TCM199 e no grupo BOEC entre o meio TCM199 e os meios CZB e B₂, enquanto no grupo MOEC não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os meios CZB, TCM199 e B₂.

DISCUSSÃO

Os estudos sobre o desenvolvimento de embriões de camundongos mostraram que há diferença entre os estádios embrionários durante o cultivo *in vitro*¹⁴. O cultivo *in vitro* de zigotos de camundongos apresenta algumas restrições, pois muitas linhagens possuem bloqueio no estágio de 2 células. A

* Center for Disease Control and Prevention

** Delaware Division of Public Health

falha no desenvolvimento pode ser reflexo de ativação inadequada ou parcial do genoma embrionário durante a fase de transcrição¹¹. No entanto, a utilização de linhagens híbridas a partir do estágio de 2 células possibilitou o desenvolvimento normal dos embriões⁴⁴. Sabe-se que há influência do oviduto sobre o desenvolvimento de embriões entre os estádios de 2 e 4 células², interação entre as proteínas de alto e de baixo peso molecular do fluido do oviduto e do embrião^{10,25,27} e presença de fatores autócrinos e parácrinos que estimulam a interação do oviduto com o embrião⁹. A utilização de segmento ou do órgão para o cultivo de embriões de camundongos, fecundados *in vitro*^{5,32,43} ou colhidos nas fases de zigoto⁴⁶ e de 8 a 16 células²³ possibilitou avaliar o desenvolvimento de embriões até o estágio de blastocisto e estudar novas formas de cultivo *in vitro*²⁷. O oviduto tem papel ativo no desenvolvimento embrionário de mamíferos², podendo ser mimetizado *in vitro* pelo cultivo apropriado das células epiteliais do oviduto. No entanto, para embriões de camundongos, a ação metabólica das células epiteliais do oviduto parece alterar os fatores específicos que aumentam a taxa de clivagem³⁶.

No presente estudo, mesmo na presença de células epiteliais, o co-cultivo de zigotos nos meios TCM199 e B₂, mais complexos, não proporcionou desenvolvimento além do estágio de 2 células (Tab. 1), o que não ocorreu com o meio CZB. Provavelmente a glicose teve efeito inibitório ou as células não foram capazes de transformar a glicose presente nos meios³⁹, o suficiente para que os embriões pudessem desenvolver-se normalmente. *In vivo*, esta baixa concentração de glicose no fluido do oviduto parece ser devida à metabolização de parte da glicose pelas células do *cumulus*¹². No entanto, não foi observada diferença no desenvolvimento *in vitro* de zigotos em ovidutos de camundongas quando foram cultivados com e sem células do *cumulus*⁴⁵. O cultivo e o co-cultivo de zigotos no CZB livre de glicose possibilitaram seu desenvolvimento além de 2 células, observando-se que, no D-4 do embrião, houve clivagens até os estádios de mórula e de blastocisto no CZB controle (73,04%), no CZB com MOEC (85,85%) e no CZB com BOEC (47,90%), conforme mostra a Tab. 1, sugerindo que a ausência da glicose foi o fator determinante para a ultrapassagem do bloqueio. Entretanto, do estágio de mórula até o de blastocisto expandido houve decréscimo nas taxas de desenvolvimento (Tab. 1), mostrando que há necessidade de glicose a partir do estágio de mórula^{6,37,40}. Em bovinos, durante o desenvolvimento embrionário, a metabolização da glicose foi mais efetiva nos estádios de 8 a 16 células, acentuando-se ainda mais na fase de expansão do blastocisto³⁵, quando há maior demanda de energia.

Os experimentos do presente estudo, que utilizaram embriões de 2 células no cultivo sem células e no co-cultivo com MOEC e BOEC nos meios CZB livre de glicose, TCM199 e B₂, mostraram desenvolvimento até o estágio de blastocisto em todos os grupos (Tab. 2). Nos grupos controle, a taxa de bloqueio no

D-4 dos embriões apresentou-se menor no cultivo com o CZB sem glicose (Tab. 3). Nesta fase, os embriões metabolizam grandes quantidades de glutamina³⁴, devido ao bloqueio da glicólise causada pela inibição da piruvatoquinase³⁴, o qual pode estar relacionado à conservação da glicose para períodos subsequentes ou ao aumento da demanda de energia³³. Suspeita-se que a presença da glutamina no CZB pode ter efeito benéfico nestes períodos sobre o desenvolvimento dos embriões.

Observou-se que os embriões do grupo com CZB, aparentemente, não sofreram influência benéfica das células epiteliais MOEC e BOEC, havendo, a partir do estágio de mórula, atraso de desenvolvimento dos embriões em cultivo e em co-cultivos, sugerindo que a ausência da glicose representa fator limitante para a evolução até blastocisto (Tab. 2). Avaliando-se os grupos de embriões de 2 células cultivados e co-cultivados no TCM199 e no B₂, observa-se que, no D-4 do embrião, o total de embriões em estádios de mórula e de blastocisto no co-cultivo em TCM199 com MOEC foi inferior ($p \leq 0,05$) em relação ao TCM199 controle e com BOEC, sugerindo que a BOEC se adaptou melhor ao TCM199 ou que houve ineficiência de metabolização da glicose pelas células, o que não proporcionou meio adequado para o desenvolvimento embrionário (Tab. 2). Porém, não houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) quando se comparou o B₂ com MOEC e o B₂ controle ou com BOEC, sugerindo que ambas as células adaptaram-se de maneira semelhante ao meio (Tab. 2). Por outro lado, o total de blastocistos expandidos e eclodidos no D-5 do embrião demonstrou que os meios TCM199 e B₂, ambos com MOEC e BOEC, não apresentaram diferença estatística quando comparados aos seus controles sem células (Tab. 2). Os totais de embriões até blastocistos em células MOEC não apresentaram diferença estatística entre os meios CZB, TCM199 e B₂ (Tab. 3). Porém, quando comparou-se o co-cultivo com BOEC, o melhor desenvolvimento foi observado no TCM199 (Tab. 3). Estes resultados sugerem que houve melhor aproveitamento dos componentes dos meios pelas células e pelos embriões a partir do estágio de mórula. Nos sistemas de co-cultivo, devem ser consideradas a densidade^{18,19}, a temperatura, a umidade e a tensão de CO₂ da estufa, assim como o pH^{4,42}, a osmolaridade e a composição dos meios. No presente estudo, a osmolaridade dos meios foi mantida dentro dos limites considerados ideais, ou seja, CZB entre 274 e 295 mOsmol⁶, TCM199³ entre 270 e 300 mOsmol e B₂^b entre 275 e 305 mOsmol, enquanto que o pH variou entre 6,8 e 7,4. As diferentes composições dos meios de cultivo devem ser consideradas quando se deseja sucesso no cultivo de embriões desde o estágio de zigoto até blastocisto. Os vários meios de cultivo empregados no desenvolvimento embrionário em sistemas *in vitro* tentam mimetizar o fluido do oviduto, porém, na maioria das vezes, alguns componentes dos meios como fosfato, glicose, glutamina, lactato e piruvato

^a Gibo BRL Products e References Guide - USA

^b Laboratoire C.C.D. - INRA - França

apresentam-se com concentrações diferentes em relação ao fluido do oviduto, podendo causar tanto inibição quanto o bloqueio do desenvolvimento embrionário. Por conta disso, foram realizadas inúmeras comparações entre os meios de cultivo ou entre as alterações dos componentes para otimizar a produção de embriões^{1,6,7,12,17,19,21,28,38}, objetivando encontrar o meio ideal para o desenvolvimento embrionário. Os meios condicionados em diferentes tipos celulares¹⁵, ou os meios com e sem fontes protéicas, evidenciaram a presença de duas moléculas que atuam nas primeiras clivagens dos embriões, as quais podem ou não ser oriundas das células do oviduto²⁴. Neste estudo, as células epiteliais BOEC empregadas para o co-cultivo de embriões de camundongos comportaram-se de maneira semelhante àquela observada por Thibodeaux *et al.*⁴¹. Porém, as células em suspensão não apresentaram sinais de degeneração nos cultivos considerados controle até o quinto dia⁷.

Deve-se lembrar que *in vivo*, no fluido do oviduto, são sintetizadas e secretadas proteínas pelas células do oviduto, além de diferentes substâncias provenientes do plasma sanguíneo^{9,22}. Durante as diferentes fases do ciclo estral, mudanças funcionais ocorrem tanto nas células ciliadas quanto nas células secretoras do oviduto, as quais são moduladas pelo estrogênio e pela progesterona nas diversas espécies animais^{29,30,31,45,46}. Partindo destas mudanças observadas durante o ciclo estral nas diferentes espécies, sugere-se que o oviduto não é espécie-específico quanto a sua capacidade em promover o desenvolvimento de embriões¹⁰. No presente estudo, a utilização de células epiteliais de ovidutos de bovinos (BOEC) no co-cultivo de zigotos de camundongos, demonstrou-se que não há especificidade, pois houve desenvolvimento de zigotos até o estágio de mórula, embora em taxa inferior ao controle e ao co-cultivo com MOEC (Tab. 1). Ao verificar o total de blastocistos expandidos e eclodidos, nota-se que as taxas de desenvolvimento embrionário de ambos os co-cultivos estiveram aquém do controle (Tab. 1), sugerindo que

não foi o tipo de célula que impossibilitou o desenvolvimento, mas sim a falta de componentes, como a glicose, no meio. A ocorrência de bloqueio dos zigotos na fase de 2 células nos cultivos e nos co-cultivos com TCM199 e B₂ demonstra também que não foi o tipo célula, mas provavelmente o meio que causou o bloqueio (Tab. 1). Os resultados de desenvolvimento embrionário apresentados no co-cultivo de embriões de 2 células demonstraram que as células do oviduto não são espécie-específicas, conforme trabalhos encontrados em literatura^{19,38,39,25}. O mesmo não ocorreu com Sparks *et al.*³⁹, que sugeriram que as células de ovidutos de camundongos no TCM199 podem não metabolizar a glicose o suficiente para prover ambiente adequado ao desenvolvimento total do embrião. Portanto, são necessários novos estudos para verificar a eficiência das células epiteliais de oviduto e das células estabelecidas sobre o desenvolvimento embrionário nas diferentes espécies animais. O presente estudo permitiu concluir que o bloqueio na fase de duas células dos zigotos de camundongos cultivados e co-cultivados nos meios TCM199 e B₂ pode estar relacionado à presença da glicose. A interrupção de desenvolvimento a partir do estágio de mórula no CZB ocorreu, provavelmente, pela ausência de glicose. O desenvolvimento de embriões de camundongos em co-cultivo com células epiteliais de ovidutos não é espécie-específica, pois foi observada evolução dos zigotos e dos embriões de 2 células até o estágio de blastocisto no co-cultivo com BOEC. O desenvolvimento de zigotos de camundongos até blastocistos é possível em meio simples quimicamente definido como o CZB sem glicose.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq, pelo suporte financeiro para a realização do projeto, e ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pelo uso das instalações.

SUMMARY

Mouse embryos were cultured and co-cultured in mouse (MOEC) and bovine (BOEC) oviduct epithelial cells suspension. Embryos were co-cultured from one cell and two-cell stage to blastocyst stage. Cell culture (MOEC and BOEC) was made at a 100 µl drop under oil. Embryos were recovered 24-26 hours in the case of zygotes and 46-48 hours in the case of 2 cell embryos after hCG injection. Total embryos were randomly split into 3 groups: control (cultured), MOEC and BOEC (co-cultured) with CZB, TCM199 and B₂ mediums. In CZB group, 44 zygotes (38.26%) from the control achieved blastocyst stage (expanded or hatched), being statistically different (p<0.05) from MOEC (1.89%) and BOEC (6.72%). Co-culture with zygotes in TCM199 and B₂ didn't pass 2 cell block. Two cell embryos cultured in CZB achieved blastocyst stage at a rate of 43.80% for the control, 38.79% for MOEC and 29.60% for BOEC group. Statistical difference (p<0.05) appears from the control with BOEC groups. In TCM 199 medium, total of blastocyst were 48.15% for the control, 39.08% for MOEC and 48.49% for the BOEC groups, having no statistical difference among groups. This study allowed concluding that zygote block in TCM199 and B₂ medium may be related to the presence of glucose. And that mouse embryos development is not species-specific.

UNITERMS: Cells cultured; Epithelial cells; Embryos; Mice.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AVERY, B.; BRANDENHOFF, H.R.; GREVE, T. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine embryos, cultured from days 1-5 post insemination in either menezó-B2 medium or in HECM-6 medium. **Theriogenology**, v.44, n.7, p.935-45, 1995.
- 2- BAVISTER, B.D. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. **Theriogenology**, v.29, n.1, p.143-54, 1988.
- 3- BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.P.M.; GOTLIEB, S.L.D. Bioestatística. São Paulo, E.P.U., 1981. p.50.
- 4- BRINSTER, R.L. A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. **Experimental Cell Research**, v.32, n.1, p.205-8, 1963.
- 5- BRINSTER, R.L.; BIGGERS, J.D. *In vitro* fertilization of mouse ova within the explanted fallopian tube. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.10, p.277-9, 1965.
- 6- CHATOT, C.L.; ZIOMEK, C.A.; BAVISTER, B.D.; LEWIS, J.L.; TORRES, I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.86, n.2, p.679-88, 1989.
- 7- ELLINGTON, J.E.; CARNEY, E.W.; FARRELL, P.B.; SIMKIN, M.E.; FOOTE, R.H. Bovine 1-2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. **Biology of Reproduction**, v.43, n.1, p.97-104, 1990.
- 8- EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Co-culture of early cattle to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.85, n.2, p.715-20, 1989.
- 9- GANDOLFI, F. Autoocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. **Theriogenology**, v.41, n.1, p.95-100, 1994.
- 10- GANDOLFI, F.; BREVINI, T.A.L.; MOOR, R.M. Effect of oviduct environment on embryonic development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.107-15, 1989. Suplemento.
- 11- GANDOLFI, F.; MOOR, R.M. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, n.1, p.23-8, 1987.
- 12- GARDNER, D.K.; LEESE, H.J. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, n.1, p.361-8, 1990.
- 13- GODDARD, M.J.; PRATT, H.P.M. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the "2-cell block". **Journal Embryology Experimental Morphology**, v.73, p.111-33, 1983.
- 14- HAMMOND, J. Recovery and culture of tubal mouse ova. **Nature**, v.163, n.4131, p.28-9, 1949.
- 15- HERNANDEZ-LEDEZMA, J.J.; VILLANUEVA, C.; SIKES, J.D.; ROBERTS, R.M. Effects of CZB versus medium 199 and of conditioning culture media with either bovine oviductal epithelial cells or buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by *in vitro* maturation - *in vitro* fertilization procedures. **Theriogenology**, v.39, n.7, p.1267-77, 1993.
- 16- HOGAN, B.; COSTANTINI, F.; LACY, E. **Manipulating the Mouse Embryo a Laboratory Manual**. New York : Cold Spring Harbor, 1986, 332p.
- 17- KANE, M.T.; CARNEY, E.W.; ELLINGTON, J.E. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. **Theriogenology**, v.38, n.2, p.297-313, 1992.
- 18- KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effects of the culture density of mouse zygotes on the development *in vitro* and *in vivo*. **Theriogenology**, v.41, n.6, p.1315-22, 1994.
- 19- KEEFER, C.L.; STICE, S.L.; PAPROCKI, A.M.; GOLUEKE, P. *In vitro* culture of bovine IVM-IVF embryos: cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. **Theriogenology**, v.41, n.6, p.1323-31, 1994.
- 20- KRISHER, R.L.; PETERS, R.M.; JOHNSON, B.H. Effect of oviductal condition on the development of one-cell porcine embryos in mouse or rat oviducts maintained in organ culture. **Theriogenology**, v.32, n.6, p.885-92, 1989.
- 21- LAWITTS, J.A.; BIGGERS, J.D. Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium. **Biology of Reproduction**, v.45, n.2, p.245-51, 1991.
- 22- LEESE, H.J. The formation and function of oviduct fluid. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, n.2, p.843-56, 1988.
- 23- MCLAREN, A.; BIGGERS, J.D. Successful development and birth of mice cultivated *in vitro* as early embryos. **Nature**, v.182, n.4639, p.877-8, 1958.
- 24- MERMILLOD, P.; VANSTEENBRUGGE, A.; WILS, C.; MOURMEAUX, J.-L.; MASSIP, A.; DESSY, F. 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.582-7, 1993.
- 25- MINAMI, N.; KATO, H.; INOUE, Y.; YAMADA, M.; UTSUMI, K.; IRITANI, A. Nonspecies-specific effects of mouse oviducts on the development of bovine IVM/IVF embryos by a serum free co-culture. **Theriogenology**, v.41, n.7, p.1435-45, 1994.
- 26- MINAMI, N.; UTSUMI, K.; IRITANI, A. Effects of low molecular weight oviductal factors on the development of mouse one-cell embryos *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.96, n.2, p.735-45, 1992.
- 27- MINAMI, N.; UTSUMI, K.; IRITANI, A. Oviductal tissue is effective at a certain critical age of mouse embryo. **Theriogenology**, v.35, n.1, p.243, 1991. (abstr.)
- 28- MOORE, K.; BONDIOLI, K.R. Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of *in vitro* matured and fertilized cattle embryos. **Biology of Reproduction**, v.48, n.4, p.833-40, 1993.
- 29- NAYAK, R.K.; ELLINGTON, E.F. Ultrastructural and ultracytochemical cyclic changes in the bovine uterine tube (oviduct) epithelium. **American Journal Veterinary Research**, v.38, p.157-68, 1977.
- 30- NAYAK, R.K.; ZIMMERMAN, D.R. Effect of estrogen and progesterone on the ultrastructure of porcine oviduct epithelium. **Journal of Animal Science**, v.33, n.5, p.1161, 1971a. (abstr.)
- 31- NAYAK, R.K.; ZIMMERMAN, D.R. Ultrastructural changes in porcine oviduct epithelium during the estrus cycle. **Journal of Animal Science**, v.33, n.1, p.262, 1971b. (abstr.)
- 32- PAVLOK, A. Development of mouse ova in explanted oviducts: fertilization, cultivation, and transplantation. **Science**, v.157, n.3795, p.1457-8, 1967.
- 33- RIEGER, D. The measurement of metabolic activity as an approach to evaluating viability and diagnosing sex in early embryo. **Theriogenology**, v.21, n.1, p.138-49, 1984.
- 34- RIEGER, D.; GUAY, P. Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocysts. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, n.2, p.585-91, 1988.
- 35- RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N.M.; BETTERIDGE, K.J. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, n.2, p.585-95, 1992.

- 36- SAKKAS, D.; TROUNSON, A.O. Co-culture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pseudopregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, n.1, p.109-18, 1990.
- 37- SCHINI, S.A.; BAVISTER, B.D. Two-cell block to developmental of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. **Biology of Reproduction**, v.39, n.5, p.1183-92, 1988.
- 38- SHARIF, H.; VERGOS, E.; LONERGAN, P.; GALLAGHER, M.; KINIS, A.; GORDON, I. Development of early bovine embryos in the isolated mouse oviduct maintained in organ culture. **Theriogenology**, v.35, n.1, p.270, 1991. (abstr.)
- 39- SPARKS, A.E.T.; GWAZDAUSKAS F.C.; MCGILLIARD, M.L. Culture of one-cell bovine embryos in explanted mouse oviduct and bovine oviductal epithelial cells. **Theriogenology**, v.37, n.3, p.587-94, 1992.
- 40- 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.963-78, 1992.
- 41- THIBODEAUX, J.K.; MYERS, M.W.; GOODEAUX, L.L.; MÉNÉZO, Y.; ROUSSEL, J.D.; BROUSSARD, J.R.; GODKE, R.A. Evaluating an *in vitro* culture system of bovine uterine and oviduct epithelial cells for subsequent embryo co-culture. **Reproduction Fertility and Development**, v.4, n.5 p.573-83, 1992.
- 42- WHITTEN, W.K. Culture of tubal mouse ova. **Nature**, v.177, p.96, 1956.
- 43- WHITTEN, W.K. Culture of tubal ova. **Nature**, v.179, n.4569, p.1081-2, 1957.
- 44- WHITTEN, W.K.; BIGGERS, J.D. Complete development *in vitro* of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.17, n.2, p.399-401, 1968.
- 45- WHITTINGHAM, D.G. Development of zygotes in cultured mouse oviducts. I-The effect of varying oviductal conditions. **Journal of Experimental Zoology**, v.169, p.391-8, 1968a. WHITTINGHAM, D.G. Development of zygotes in cultured mouse oviducts. II-The influence of the estrous cycle and ovarian hormones upon the developmental of the zygote. **Journal of Experimental Zoology**, v.169, p.399-405, 1968b.
- 46- WHITTINGHAM, D.G.; BIGGERS, J.D. Fallopian tube and early cleavage in the mouse. **Nature**, v.213, p.942-3, 1967.

Recebido para publicação: 17/06/1998

Aprovado para publicação: 24/05/1999