

## ANÁLISE MORFOLÓGICA DE EMBRIÕES OVINOS PRODUZIDOS EM LABORATÓRIO A PARTIR DE OÓCITOS ASPIRADOS DE DOADORAS MULTÍPARAS, PRIMÍPARAS E PRÉ-PÚBERES DA RAÇA SANTA INÊS

JOÃO FLÁVIO PANATTONI MARTINS<sup>1</sup>, THAINÁ DE OLIVEIRA SANTOS<sup>2</sup>; MARCOS DONIZETE DA SILVA<sup>2</sup>, BRUNA NANZER SOUZA<sup>2</sup>, PRISCILA CARVALHO DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, ADAUTO DE CARVALHO ROSAS FILHO<sup>1</sup>, ROGÉRIO NAVARRO DE ABREU<sup>1</sup>, CRISTIANE LEITE FIGUEIREDO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Professores UNIFEOB - São João da Boa Vista – SP CEP 13874-159 [joaoflavio@unifeob.edu.br](mailto:joaoflavio@unifeob.edu.br)

<sup>2</sup> Alunos do Curso de Medicina Veterinária - UNIFEOB - São João da Boa Vista – SP

**RESUMO:** Este trabalho teve como objetivo analisar a morfologia de embriões aos sete dias de desenvolvimento, produzidos em laboratório a partir de oócitos aspirados de três diferentes classes de doadoras da raça Santa Inês (multíparas, primíparas e pré-púberes). Os embriões analisados apresentaram forma discoidal e estavam delimitados pela zona pelúcida (ZP). Nos estádios de mórula e blastocisto inicial, a ZP média de 5 a 10 µm de espessura, revelando-se mais delgada em fase de blastocisto expandido. De modo geral, a estrutura e ultra-estrutura dos embriões ovinos da raça Santa Inês, oriundos de fecundação *in vitro* (FIV) e avaliados neste estudo, corroboram muitas das observações de Colarco e McLaren (1976), Ferrer et al. (1995) e Coccerro et al. (2002). O aspecto mais marcante, foi a intensa distribuição uniforme de inclusões lipídicas no citoplasma dos blastômeros, tanto da massa celular interna quanto nas células trofoblásticas, independente da origem do oócito, sugerindo que a morfologia parece estar condicionada principalmente ao sistema de cultivo empregado, o qual parece favorecer o acúmulo de lípidos intracelulares.

**PALAVRAS-CHAVE:** Embriões, Fecundação *in vitro*, Ovinos, Santa Inês

### INTRODUÇÃO

Os procedimentos de aspiração folicular, maturação e fecundação *in vitro* de oócitos, viabilizaram a exploração do potencial reprodutivo das fêmeas de maneira revolucionária, oferecendo a possibilidade de aceleração do ganho genético através da redução do intervalo entre gerações e a maximização do número de nascimentos a partir de fêmeas de alto valor genético. Sendo assim, a produção de embriões fertilizados *in vitro*, a partir da aspiração folicular de doadoras ovinas adultas e juvenis, têm sido exploradas (BALDASSARRE et al., 1996; GALLI et al., 2001; BALDASSARRE e KARATZAS et al., 2004). Com a expansão da ovinocultura no Brasil, a raça Santa Inês tornou-se uma das principais bases do plantel Nacional, difundindo-se por todo país, como animal ideal para a produção de carne e couro adaptado às condições tropicais.

Este trabalho teve como objetivo analisar a morfologia de embriões aos sete dias de desenvolvimento, produzidos em laboratório a partir de oócitos aspirados de doadoras da raça Santa Inês múltíparas, primíparas e pré-púberes.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Embriões FIV oriundos de oócitos recuperados a partir de fêmeas Santa Inês adultas (multíparas e primíparas) e pré-púberes, foram devidamente processados e analisados sob microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Para análise morfológica, foram consideradas as percentagens de área das variáveis: citoplasma, núcleo, inclusões lipídicas e vesículas endossômicas de blastômeros de embriões viáveis segundo as diferentes classes de doadoras, também foi avaliada a morfologia de blastômeros de embriões que tiveram o desenvolvimento bloqueado logo após a clivagem.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises estruturais e ultra-estruturais mostraram, que a organização e morfologia dos blastômeros foi bastante semelhante nos embriões ovinos provenientes das três classes de

doadoras Santa Inês, assim como, a morfologia e a distribuição da maioria dos componentes celulares. Diferenças significativas foram observadas em relação aos blastômeros de embriões que sofreram o bloqueio de desenvolvimento, os quais apresentaram maior percentagem de área de vesículas endossômicas e área de inclusões lipídicas inferior, quando comparadas aos blastômeros das demais classes de embriões (Tabelas 1 e 2, gráfico1) De modo geral os blastômeros exibiram um padrão morfológico caracterizado pela alta concentração citoplasmática de inclusões lipídicas distribuídas de maneira uniforme, entremeadas por algumas vesículas de aspecto homogêneo contendo material de média eletrondensidade, semelhantes a vacúolos endossômicos, além de vesículas de dimensões variáveis e apresentando material parcialmente digerido de diferentes eletrondensidades, presentes em algumas amostras. Mitocôndrias de formas variadas, principalmente arredondadas ou alongadas estavam distribuídas por todo o citoplasma, destacadas pela ósmiofilia e freqüentemente associadas a inclusões lipídicas. Grande número de ribossomos e poliribossomos foram constatados no citoplasma destas células e em algumas amostras, a incidência de restos celulares na blastocele e/ou espaço perivitelínico.

Ultra-estruturalmente, as células mostraram-se unidas entre si por complexos juncionais constituídos de zônulas de oclusão e desmossomos. Projeções formando interdigitações foram observadas entre as membranas laterais de células trofoblásticas contíguas. Na superfície livre destas células, embora tenha-se constatado a presença de microvilos em contato com o espaço perivitelínico, várias amostras apresentaram ausência total destas estruturas.

De modo geral, os núcleos dos blastômeros são centrais, apresentam predomínio de eucromatina e um ou dois nucléolos proeminentes e freqüentemente foram observadas figuras de mitose. Células com características degenerativas e de morte celular foram observadas tanto na massa celular interna como na camada de células trofoblásticas. As poucas diferenças observadas residem na presença de aumento do espaço perivitelínico e da blastocele, em algumas amostras, conseqüentemente, a ZP mantinha-se mais afastada dos blastômeros. Eventualmente foram observadas formas embrionárias bizarras (deformidades) associadas ao aumento da incidência de células degeneradas. Vários autores vêm pesquisando a relação entre reservas lipídicas intracelulares de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento, produzidos tanto *in vivo* como *in vitro*, com os fatores de tolerância aos procedimentos de congelação e descongelação (MURAKAMI et al., 1998), qualidade embrionária (ABE et al., 2002a) e protocolos de suplementação para desenvolvimento *in vitro* (ABE et al., 1999; 2002). Experimento *in vitro* investigando o metabolismo de embriões de rato em várias fases do desenvolvimento pré-implantacional frente aos ácidos graxos exógenos presentes no meio de cultura, indicam que os ácidos graxos são certamente utilizados como fonte energética e na síntese de vários lípidos por meio da beta-oxidação, ciclo de Krebs e lipogênese (KHANDOKER & TSUJII, 1999).

Sistemas de cultivo *in vitro* podem resultar embriões de qualidade morfológica inferior quando comparados aos produzidos *in vivo* (VAN SOOM et al., 1997), bem como, favorecer o acúmulo de lípidos intra celulares (ABE et al., 2002)

Thompson e colaboradores em 1995, baseados em estudos qualitativos reportam que a adição de soro fetal ao meio de cultivo de blastocistos ovinos, resultaram em um aparente aumento no número de vesículas lipídicas e diminuição no número de mitocôndrias. Embora a não utilização de soro nos meios de cultivo *in vitro* proporcione uma condição morfológica comparável aos blastocistos produzidos *in vivo*, a adição de soro ao meio resulta em um maior número de blastocistos e melhora o desenvolvimento embrionário.

A análise de blastocistos bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* em nível ultra-estrutural registra alterações no processo de diferenciação embrionária naqueles produzidos *in vitro*, que variam de acordo com as condições de cultivo utilizadas para a produção *in vitro* de embriões (CROSIER et al., 2000). Além disso, embriões produzidos *in vitro* podem apresentar morfologia alterada, desenvolvimento tardio, aumento de vacuolização, redução dos pontos de contato entre as células e menor número de células (THOMPSON et al., 1995).

Entretanto Cocero e colaboradores em 2002, analisando características ultra-estruturais de embriões ovinos frescos e criopreservados, também relatam a presença abundante de gotas lipídicas no citoplasma dos embriões frescos, tanto de células trofoblásticas quanto da massa celular interna.

A presença de vesículas de dimensões variáveis, contendo material citoplasmático parcialmente digerido que pode apresentar diferentes eletrondensidades, é um achado comum quando se utiliza a microscopia eletrônica de transmissão para estudo de embriões mamíferos em fase de pré-implantação (CALARCO e MCLAREN, 1976; ABE et al., 1999; 2002b; CROSIER et al., 2000, VISINTIN et al., 2002).

Estas estruturas lembram a formação de vacúolos fagossômicos com ou sem a fusão de lisossomas secundários.

Após a fecundação, as proteínas citoplasmáticas maternas presentes no oócito são degradadas e a partir da clivagem, ocorre um bloqueio de desenvolvimento normalmente durante o quarto ou entre o quarto e o quinto ciclo de replicação dos blastômeros, quando ocorre uma espécie de transição materno-embriônica, ou seja, a ativação decisiva do genoma embrionário com a transcrição dos RNAm a partir do seu próprio genoma, etapa esta essencial como condição para continuar a se desenvolver (MEMILI & FIRST, 2000; MEIRELLES et al., 2004)

Sendo assim, as mórulas e blastocistos viáveis produzidos in vitro, são oriundas dos zigotos que conseguiram a superação deste bloqueio de desenvolvimento e a conseqüente ativação do genoma embrionário. Neste sentido, estudo realizado por Tsukamoto et al em 2008, utilizando embriões murinos comprova que a autofagia é um fenômeno essencial para o desenvolvimento embrionário em mamíferos, atribuindo importância decisiva aos lisossomas neste período e a conseqüente presença de vesículas de auto-digestão.

Estas hipóteses parecem explicar as diferenças significativas observadas em relação aos blastômeros de embriões que sofreram o bloqueio de desenvolvimento. Nestas amostras poucas vesículas contendo materiais provenientes de digestão celular foram observadas, sendo que a presença de maior percentagem de área de vesículas endossômicas e menor percentagem de área de inclusões lipídicas, sugere que o metabolismo embrionário foi interrompido antes que os blastômeros pudessem iniciar efetivamente os processos de autodigestão e incorporação dos nutrientes e gradientes hormonais presentes no meio de cultivo, os quais pareciam favorecer o acúmulo de lípidos intracelulares como discutido anteriormente.

## CONCLUSÃO

Presume-se que a diferença entre as classes de fêmeas estudadas resida na quantidade e qualidade dos oócitos que apresentaram competência em superar as fases de clivagem e bloqueio do desenvolvimento embrionário, viabilizando mórulas e blastocistos aparentemente saudáveis e aptos à transferência. Em nível morfológico, nossos resultados sugerem que a qualidade morfológica dos oócitos influi diretamente no rendimento de embriões no D7, os quais parecem apresentar um padrão morfológico condicionado ao sistema de cultivo utilizado.

## REFERÊNCIAS

- ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. **Anat Embryol (Berl)**, 199(6):519-27, 1999. **Mol Reprod Devel.**, 61(1):57-66, 2002 a.
- ABE, H.; MATSUZAKI, S.; HOSHI, H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. **Theriogenology**; v. 57(4): 1273-83, 2002 b.
- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. **Anat Embryol (Berl)**, 199(6):519-27, 1999.
- BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Anim Reprod Sci** v. 83-82, p. 255-266, 2004.
- BALDASSARRE, H.; FURNUS, C.C.; DEMATOS, D.G.; PESSI, H. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocytes donors. **Theriogenology**; v. 45, p. 707-717, 1996.
- CALARCO, P.; MCLAREN, A. Ultrastructural observations of preimplantation stages of the sheep. **J Embryol Exp Morphol.**, 36(3):609-22, 1976.

- COCCERO, M.; ESPINA, M.; AGUILAR, B. Ultrastructural characteristics of fresh and frozen-thawed ovine embryos using two cryoprotectants. **Biology of Reproduction**, 66(5):1244, 2002.
- CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1459-1465, 2000.
- CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1375-1385, 2001.
- FERRER, F.; GARCIA, C.; VILLAR, J.; ARIAS, M. Ultrastructural study of the early development of the sheep embryo. **Anat Histol Embryol.**, 24(3):191-6, 1995.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, P.; TURINI, R.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**; v. 55, p. 1341-1357, 2001.
- KHANDOKER, M. A. M. Y.; TSUJII, H. The metabolism of exogenous fatty acid by preimplantation rat embryos. **Journal of Animal Science**, v. 12, n. 8, p. 1181-1187, 1999.
- MEIRELLES, F.V.; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F.; MERIGHE, G.K.; GARCIA, S.M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, 82 – 83, 13 – 20, 2004.
- MEMILI, E.; FIRST, N.L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, 8, 87-96, 2000.
- THOMPSON, J. G.; BELL, A. C. S.; TERVIT, H. R. Partitioning of glucose carbon in post-compaction ovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 119-126, 1995.
- TSUKAMOTO, S.; KUMA, A.; MURAKAMI, M.; KISHI, C.; YAMAMOTO, A.; MIZUSHIMA, N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. **Science**; v4, 321 (5885): 117-20; 2008.
- VAN SOOM, A.; BOERIAN, M.L.; VANROOSE, G.; LEIN, A.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced *in vivo* after superovulation. **Biol Reprod**; v.57, p.1041-1049, 1997.
- VISINTIN, J.A.; MARTINS, J.F.P.; BEVILACQUA, E.M.; MELLO, M.B.; NICÁCIO, A.C.; ASSUMPÇÃO, M.E O A. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different?. **Theriogenology**, v. 57, p. 345-359, 2002.

Tabela 1. Valores médios da análise morfológica de citoplasma e núcleo de blastômeros de embriões FIV representantes dos grupos analisados

| Grupos             | Citoplasma |   | Núcleo     |   |
|--------------------|------------|---|------------|---|
| <b>Bloqueados</b>  | 51,77±2,02 | A | 15,02±0,73 | A |
| <b>Múltiparas</b>  | 49,08±1,81 | A | 14,90±0,66 | A |
| <b>Pré Puberes</b> | 49,52±2,34 | A | 15,13±0,85 | A |
| <b>Primíparas</b>  | 47,92±2,02 | A | 15,80±0,73 | A |

Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo Teste t;

Tabela 2. Valores médios da análise morfológica de inclusões lipídicas e vesículas endossômicas de blastômeros de embriões FIV representantes dos grupos analisados

| Grupos             | Inclisões Lipídicas |   | Vesículas Endossômicas |   |
|--------------------|---------------------|---|------------------------|---|
| <b>Bloqueados</b>  | 12,63±1,65          | B | 20,32±1,75             | A |
| <b>Múltiparas</b>  | 32,23±1,47          | A | 3,22±1,57              | B |
| <b>Pré Puberes</b> | 32,12±1,90          | A | 2,99±2,02              | B |

**Primíparas**

32,27±1,65

A

3,71±1,75

B

Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo Teste t;