

# VARIABILIDADE NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES DE *Mus domesticus domesticus*

(VARIABILITY IN THE PRODUCTION OF *Mus domesticus domesticus* EMBRYOS)

(VARIABILIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE *Mus domesticus domesticus*)

L. P. C. BAPTISTA<sup>1</sup>, M.C. LANGE<sup>2</sup>, J. L. RODRIGUES<sup>3</sup>

## RESUMO

O objetivo do experimento foi verificar a variabilidade na produção de embriões de *Mus domesticus domesticus* linhagem CF1, determinando as taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto e blastocisto eclodido. Foram obtidas 4196 estruturas de 74 fêmeas, acasaladas individualmente com 5 diferentes machos da mesma linhagem. Os zigotos de cada fêmea doadora foram cultivados *in vitro* em meio KSOM, em atmosfera gasosa úmida com 5 % de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C durante 120 horas. As fêmeas foram distribuídas em cinco grupos (G1 a G5) de acordo com o número de estruturas coletadas e conforme o número de tratamentos superovulatórios a que foram submetidas. A análise dos dados revelou a existência de variabilidade na produção de embriões e na eficiência (P<0,05) das fêmeas em resposta ao primeiro tratamento superovulatório. Os machos também influenciaram nos resultados (p<0,05), destacando-se o de número cinco (5) como o de maior potencial na produção de embriões. Os resultados evidenciaram uma variabilidade no número e na capacidade de desenvolvimento dos embriões *Mus domesticus domesticus* linhagem CF1, considerando-se a fêmea doadora, o macho empregado e a reutilização das fêmeas que fracassaram no primeiro acasalamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** Variabilidade. Zigotos. Cultivo. Clivagem. Pré-implantação.

## SUMMARY

The aim of this experiment was to verify the variability of the *Mus domesticus domesticus* (CF1 strain) to produce viable embryos. We collected 4196 structures from 74 females individually mated with five (5) different males. The zygotes of each female donor were cultured *in vitro* in KSOM medium incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> air humidified atmosphere for 120 h. Females were distributed in five groups (G1- G5) according to the number of collected structures and the number of superovulatory treatments that they were submitted. Analysis of data showed a variability in the embryo production capacity among the females and in response to the first superovulatory treatment (p<0.05). The males also played a role in the results (p<0.05). Thereby, male number five (5) presented the greatest potential for embryo production. The embryonic cleavage and the development rates to the blastocyst and hatched blastocyst stage were determined. Results demonstrated variability in the number of produced embryos and their development competence to reach the hatched blastocyst stage taking into account the female donor and the male.

**KEY-WORDS:** Variability. Zygotes. Culture. Cleavage. Preimplantation.

---

<sup>1</sup> Bióloga, Mestre pelo programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias - UFRGS.

<sup>2</sup> Acadêmico de Medicina Veterinária - UFRGS.

<sup>3</sup> Professor Titular da Faculdade de Veterinária - UFRGS. Pesquisador do CNPq. Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução. Caixa Postal 15.004. Porto Alegre-RS. CEP:91501-970. E-mail: jlr@orion.ufrgs.br

## RESUMEN

El objetivo del experimento fue verificar la variabilidad en la producción de embriones de *Mus domesticus domesticus* linaje CF1, determinando las tasas de clivaje y de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto y blastocisto eclosionado. Fueron obtenidas 4196 estructuras de 74 hembras, cruzadas individualmente con 5 diferentes machos del mismo linaje. Los cigotos de cada hembra donadora fueron cultivados *in Vitro* en medio KSOM, en atmósfera gaseosa húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a temperatura de 37°C, durante 120 horas. Las hembras fueron distribuidas en 5 grupos (G1 a G5), de acuerdo con el número de estructuras colectadas y conforme el número de tratamientos de superovulación a que fueron sometidas. El análisis de los datos reveló la existencia de variabilidad en la producción de embriones y en la eficiencia ( $p < 0,05$ ) de las hembras en respuesta al primer tratamiento superovulatorio. Los machos también influenciaron los resultados ( $p < 0,05$ ) destacándose el número 5 (5) como el de más alto potencial en la producción de embriones. Los resultados evidenciaron variabilidad en el número y en la capacidad de desarrollo de los embriones *Mus domesticus domesticus* linaje CF1, considerándose la hembra donadora en el primer acasalamiento.

**PALABRAS CLAVE:** Variabilidad. Zigotos. Cultivo. Clivaje. Preimplantación.

## INTRODUÇÃO

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

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

O oócito contém todas as proteínas e/ou transcritos necessários ao desenvolvimento do zigoto (EPPIG et al., 1998; MÉNÉZO et al., 1998) pois, após a fecundação, os produtos acumulados no oócito controlam os primeiros eventos do desenvolvimento embrionário (LATHAM et al., 1991; LATHAM e SOLTER, 1991 e RENARD et al., 1994). De acordo com Poueymirou et al. (1989), a incapacidade do desenvolvimento embrionário *in vitro* além do estágio de 2 células pode ser devida à composição do meio de cultivo, sendo este um dos fatores essenciais na eficiência do sistema de cultivo em proporcionar o desenvolvimento embrionário. Por outro lado, verifica-se que delineamentos experimentais com esta espécie são comumente alvo de críticas (BAVISTER, 1995), apesar de os experimentos serem realizados com linhagens com padrão genético

conhecido e de adotar-se parâmetros capazes de identificar e descartar os embriões que possuem o potencial de desenvolvimento comprometido.

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

Os objetivos do trabalho foram determinar a variabilidade no número de embriões produzidos por doadoras *Mus domesticus domesticus* superovuladas, com capacidade de desenvolver-se *in vitro* até o estágio de blastocisto eclodido, identificar a influência dos machos sobre o número de embriões produzidos e verificar o potencial das fêmeas submetidas a duas superovulações subsequentes em produzir embriões viáveis ao desenvolvimento *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 74 fêmeas adultas (a partir de 6 semanas de idade) da espécie *Mus domesticus domesticus*, da linhagem CF1 suíça albina, acasaladas na proporção de 1 fêmea para 1 macho. Durante o experimento foram utilizados 5 machos da mesma linhagem com capacidade reprodutiva comprovada. Todos os animais foram alojados em um ambiente com temperatura controlada (22°C ± 2°C), iluminação diária de 14 horas (das 8 às 22h) e alimentação *ad libitum*, com ração peletizada e água.

As fêmeas foram induzidas à superovulação mediante aplicação via intraperitoneal de 10 UI (0,1 mL) de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Novormon® Syntex) e 46 h mais tarde de 10 UI (0,1 mL) de gonadotrofina coriônica humana (hCG. Profasi HP® Organon), quando foram acasaladas individualmente com

um dos cinco machos. Na manhã do dia seguinte ao acasalamento (dia 1 da prenhez), as fêmeas foram examinadas quanto a presença do tampão vaginal. As que apresentavam o tampão vaginal foram identificadas e alojadas em grupos para a coleta dos embriões (fêmeas placa positiva). As fêmeas que não apresentaram tampão vaginal (fêmeas placa negativa) foram agrupadas em outras gaiolas e utilizadas em nova superovulação (fêmeas reutilizadas) após um intervalo mínimo de 14 dias.

No dia 1 de prenhez (22:00h após a injeção de hCG), as doadoras de embriões foram sacrificadas por deslocamento cervical, com subsequente abertura da cavidade abdominal. Os cornos uterinos junto com os ovidutos foram retirados por duas incisões, uma na bursa ovárica separando a salpinge do ovário e a outra na base do corno uterino. As estruturas de cada uma das fêmeas foram recuperadas sob lupa estereomicroscópica, com luz incidente e magnitude de 10X, por incisão da dilatação da salpinge, quando se fez presente, ou por perfusão através do lúmen do oviduto de aproximadamente 0,2 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBSm; WHITTINGHAM, 1971) suplementada com 20 % de SFB. Após os zigotos de cada fêmea coletada eram mantidos por no máximo 30 segundos em uma gota de PBSm contendo 80 UI/mL de hialuranidase, para a dissociação das células do *cumulus oophorus*.

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

Os zigotos selecionados de cada fêmea doadora foram cultivados sob óleo mineral em gotas de 100 mL de meio KSOM (ERBACH et al., 1994) suplementado com 0,4% de BSA, em atmosfera gasosa úmida de 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C durante 120 h.

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

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

Para a comparação dos dados de produção embrionária entre os grupos de doadoras superovuladas uma vez (fêmeas novas) ou com tratamento

superovulatório repetido (placas negativas reutilizadas), foi utilizado o teste do Qui-quadrado.

## RESULTADOS

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

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

Quando foram consideradas as médias de produção embrionária (Tabela 2), a análise estatística mostrou diferença significativa entre os grupos G1, G3, G4 e G5 para o número de embriões cultivados ( $p=0,000$ ), não diferindo G3 de G2 e G4. A taxa de clivagem mostrou diferença estatística ( $p<0,05$ ) entre os grupos G1, G3, G4 e G5, não diferindo G3 de G2 e G4.

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

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

A Tabela 4 mostra que as médias de zigotos

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

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

\*o valor de p corresponde a diferenças para os dados dentro dos grupos, pelo teste de homogeneidade de variância

\*\*% de zigotos cultivados sobre o número de estruturas coletadas

\*\*\*% de clivagem sobre número de zigotos cultivados

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

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

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

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

\*média de zigotos cultivados sobre o número de estruturas coletadas

\*\*média de clivagem sobre número de zigotos cultivados

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

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

A influência da utilização de doadoras superovuladas uma única vez (fêmeas novas) ou submetidas a duas superovulações (placas negativas

reutilizadas) pode ser observada na Tabelas 5. Houve diferença significativa (p<0,05) entre os grupos de fêmeas submetidas a um ou dois tratamentos superovulatórios nas taxas de acasalamento, identificadas através das placas vaginais (fêmeas novas, 54%, vs. reutilizadas, 75%), de zigotos cultivados (novas, 70%, vs. reutilizadas, 56%), entre as taxas de clivagem (novas, 81%, vs. reutilizadas, 91%) e entre as taxas de blastocistos eclodidos (novas, 38%, vs. reutilizadas, 42%) (Tabela 5). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os dois grupos de fêmeas para as taxas de blastocistos (p>0,05; Tabela 5).

A análise dos dados mostrou que não houve correlação entre o número de estruturas inviáveis, e a taxa de clivagem, de blastocistos e de blastocistos eclodidos (p=0). O número de estruturas inviáveis só apresentou correlação com o total de zigotos coletados (P<0,001). Houve correlação significativa (p<0,01) entre o total de estruturas coletadas, zigotos cultivados e taxas de clivagem,

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

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

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

\*% de zigotos cultivados sobre o número de estruturas coletadas

\*\*% de clivagem sobre número de zigotos cultivados

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

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

Machos	Fêmeas N	Estruturas coletadas X	Zigotos cultivados*		Clivagem**		Blastocisto***		Blastocisto eclodido***	
			X	(dp)	X	(dp)	X	(dp)	X	(dp)
1	16	52	28 <sup>a</sup>	20,0	22 <sup>a</sup>	18,4	15 <sup>a</sup>	14,1	10 <sup>a</sup>	9,7
2	17	59	41 <sup>ab</sup>	28,1	32 <sup>ab</sup>	26,8	17 <sup>ab</sup>	20,6	12 <sup>a</sup>	14,5
3	11	50	28 <sup>a</sup>	16,5	24 <sup>a</sup>	15,4	14 <sup>a</sup>	16,8	9 <sup>a</sup>	11,5
4	20	53	37 <sup>ab</sup>	22,6	30 <sup>ab</sup>	21,6	17 <sup>ab</sup>	14,2	9 <sup>a</sup>	8,6
5	10	75	54 <sup>b</sup>	26,8	52 <sup>b</sup>	26,0	35 <sup>b</sup>	18,6	27 <sup>b</sup>	16,0
♦ p=			<b>0,041</b>		<b>0,017</b>		<b>0,040</b>		<b>0,003</b>	

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

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

\*média de zigotos cultivados sobre o número de estruturas coletadas

\*\*média de clivagem sobre número de zigotos cultivados

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

blastocisto e blastocisto eclodido (Anexo 1).

## DISCUSSÃO

Um dos aspectos da ativação do oócito é a retomada do ciclo celular. O oócito ativado retoma a metáfase II interrompida, completa a meiose e libera o segundo corpúsculo polar. Logo após a fecundação os pró-núcleos são formados e tem início a síntese de DNA, resultando no final do primeiro ciclo celular e início das primeiras divisões mitóticas embrionárias (XU et al., 1994). No experimento de Ozgunen et al. (2001), oócitos apresentando o primeiro corpúsculo polar, ou os dois, são definidos como oócitos maduros com potencial de

desenvolvimento ou como zigotos em desenvolvimento, respectivamente. Da mesma forma, Walton et al. (1983); Lehtonen e Kankondi (1987); Hamilton e Armstrong (1991) e Ertzeid e Storeng (1992) baseiam-se em parâmetros morfológicos, o que pode ser justificado pela sua praticidade, já que são empregados simultaneamente à coleta dos zigotos, evitando-se a excessiva manipulação e exposição às condições adversas do ambiente.

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

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

Fêmeas	Placas positivas		Estruturas coletadas		Zigotos cultivados*		Clivagem**		Blastocisto***		Blastocisto eclodido***	
	N	(%)	N	(X)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Novas	43 <sup>a</sup> /80	54	2772 <sup>a</sup>	64	1933 <sup>a</sup>	70	1559 <sup>a</sup>	81	931 <sup>a</sup>	60	591 <sup>a</sup>	38
Reutilizadas	31 <sup>b</sup> /41	75	1424 <sup>b</sup>	46	794 <sup>b</sup>	56	720 <sup>b</sup>	91	426 <sup>a</sup>	59	306 <sup>b</sup>	42
Total	74/121	61	4196	57	2727	65	2279	84	1357	60	897	39

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

\*% de zigotos cultivados sobre o número de estruturas coletadas

\*\*% de clivagem sobre número de zigotos cultivados

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

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

Licht et al. (1979) afirmaram que a eficiência da estimulação hormonal exógena varia não só pela idade, peso, linhagem, estado nutricional e de saúde, dose de gonadotrofina administrada, mas também pelas características individuais das fêmeas. Cultivando zigotos da linhagem OF1 em meio M16 e CZB, oriundos de protocolos de superovulação com FSH e eCG, Muñoz et al. (1994) mostram que o cultivo *in vitro* pode ser influenciado pela origem da gonadotrofina, dependendo do meio de cultivo usado. Em ratos, o uso de gonadotrofinas exógenas também foi associado à redução da fertilidade resultante da excessiva estimulação folicular (WALTON e ARMSTRONG, 1981; MILLER e ARMSTRONG, 1981a,b).

Para induzir a ocorrência de um grande número de ovulações, inúmeros experimentos utilizam os protocolos de superovulação com a combinação eCG-hCG (WANG et al., 2001). Por causa da longa meia-vida do eCG observada por Walton e Armstrong, (1981) nos ovários e no sangue de ratas, as diferenças na produção de oócitos e embriões podem ser atribuídas aos fatores regulatórios negativos de secreção gonadotrófica como, por exemplo, a concentração de estradiol (WANG et al., 2001 e TARÍN et al., 2002). A indução da superovulação de fêmeas CF1 no presente estudo, utilizando eCG-hCG, associado ao cultivo em meio KSOM, mostrou-se eficiente, produzindo uma média de 57 (4196/74) estruturas coletadas, 37 (2727/74) zigotos cultivados por fêmea doadora, que resultou em uma taxa de 60% (1357/2279) de blastocistos. Por outro lado, revelou também uma variação significativa entre as fêmeas doadoras em produzir embriões viáveis para o

cultivo *in vitro*, o que pode ser comprovado pela análise dos dados dentro dos grupos, bem como entre os grupos (Tabelas 1 e 2). Com a finalidade de evitar tal variação entre as fêmeas e entre as ninhadas de cada fêmea, Chatot et al. (1990) e Gardner e Lane (1996) distribuíram ao acaso os zigotos ou embriões de cada fêmea doadora entre os tratamentos.

A eficiência no desenvolvimento embrionário *in vitro* de zigotos de camundongo até o estágio de blastocisto está relacionada à linhagem e às condições de cultivo (CHATOT et al., 1990 e GARDNER e LANE 1996). Confirmando esta observação, Ménéz et al. (1998) relataram que os primeiros experimentos com um único meio de cultivo, da fecundação até o estágio de blastocisto, geram resultados com uma reduzida taxa de formação de blastocistos e também reduzida taxa de implantação por blastocisto transferido. Para Bavister (2000), esse fato aponta para a inadequação do meio de cultivo em proporcionar desenvolvimento adequado aos estádios embrionários iniciais. Ao contrário dessas observações, os resultados do presente estudo revelam taxas médias de desenvolvimento dos embriões de cada fêmea, que alcançaram no cultivo *in vitro* os estádios de blastocisto (60%) e blastocisto eclodido (39%), após 120 horas de cultivo em meio KSOM. Esses resultados corroboram as observações de Poueymirou et al. (1989), de Gardner e Lane (1996) e de Wang et al. (2001).

Bachvarova e Deleon (1980) afirmaram que 30% do mRNA materno são detectados no trofocotoderma e massa celular interna de blastocistos. Ratificando esses achados, Souza et al. (1998) relataram que a contribuição materna para o sucesso do desenvolvimento de zigotos começa durante a oogênese com a síntese e acumulação de mRNAs e proteínas. Ménéz et al. (1998) afirmaram que a formação do blastocisto é altamente dependente de fatores maternos e paternos, sendo associado ao baixo número de células o impacto evidente na taxa de eclosão. A análise dos dados do presente experimento revela a existência de variabilidade na produção de embriões, com a contribuição de fatores paternos e maternos. Há

desigualdade de variância entre os grupos de fêmeas acasaladas com os diferentes machos, nas taxas de cultivo, clivagem, blastocisto e blastocisto eclodido ( $p < 0,05$ ). Há também homogeneidade de variância dentro dos grupos de fêmeas para as taxas de cultivo, clivagem e blastocisto e diferença estatística dentro dos grupos para as taxas de blastocisto eclodido. Os resultados dessa análise permitem destacar que, mesmo existindo um potencial individual da doadora na produção de embriões, bem como na capacidade de desenvolvimento dos mesmos, esta poderá ser atenuada com o macho utilizado para o acasalamento. Verificando a influência da utilização de doadoras superovuladas uma única vez (fêmeas novas) ou submetidas à outra superovulação (fêmeas reutilizadas), observamos que as fêmeas reutilizadas após o primeiro tratamento superovulatório, tornam-se mais suscetíveis ao segundo acasalamento (Tabela 5). Do mesmo modo, a produção de estruturas e o desenvolvimento *in vitro* podem ter divergido como consequência da eliminação no primeiro tratamento superovulatório de diferentes populações foliculares em diferentes estádios do ciclo estral (WANG et al., 2001 e TARÍN et al., 2002).

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

## CONCLUSÕES

Os dados obtidos no experimento permitem as seguintes conclusões: Fêmeas *Mus domesticus domesticus* da linhagem CF1 superovuladas apresentam uma variabilidade no número de embriões produzidos, com capacidade para desenvolver-se até o estágio de blastocisto eclodido; a capacidade reprodutiva dos machos influencia o número de embriões com viabilidade de desenvolvimento produzido pelas fêmeas; e os tratamentos superovulatórios subsequentes modificam a capacidade das fêmeas em produzir embriões viáveis ao desenvolvimento *in vitro*.

ARTIGO RECEBIDO: Março/2004

APROVADO: Abril/2005

## REFERÊNCIAS

- BACHVAROVA, R., DE LEON, V. Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. **Developmental Biology**, v.74, p.1-8, 1980.
- BAVISTER, B. D. Interactions between embryos and the culture milieu. **Theriogenology**, v.53, p.619-626, 2000.
- BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, p.91-148, 1995.
- CHATOT, C. L., LEWIS, J. L., TORRES, I.; AND ZIOMECK, C. A. Development of 1-Cell embryos from different strains of mice in CZB medium. **Biology of Reproduction**, v.42, p.432-440, 1990.
- EPPIG, J. J., O'BRIEN, M. J., PENDOLA, F. L., AND WATANABE, S. Factors Affecting the Developmental Competence of Mouse Oocytes Grown In Vitro : Follicle-Stimulating Hormone and Insulin. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1445-1453, 1998.
- ERBACH, G. T., LA WITTS, J. A., PAPIOANNOU, V. E., BIGGERS, J. D. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. **Biology of Reproduction**, v.50, p.1027-1033, 1994.
- ERTZEID, G., AND STORENG, R. Adverse effect of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.96, p.649-655, 1992.
- GARDNER, D. K., AND LANE, M. Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. **Human Reproduction**, v.11, p.2703-2712, 1996.
- HAMILTON, G. S., ARMSTRONG, D. T. The superovulation of synchronous adult rats using follicle-stimulating hormone delivered by continuous infusion. **Biology of Reproduction**, v.44, p.851-856, 1991.
- LATHAM, K. E., SOLTER, D. Effect of egg composition on the developmental capacity of androgenetic mouse embryos. **Development**, v.113, p.561-568, 1991.
- LATHAM, K. E., GARRELS, J. I., CHANG, C., SOLTER, D. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. **Development**, v.112, p.921-932, 1991.

- LEHTONEN, E., KANKONDI, R. Rate of gonadotrophin-induced abnormalities in mouse ova is related to the site of hormone administration. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.80, p.613-617, 1987.
- LICHT, P., GALLO, A. B., AGGARWAL, B. B., FARMER, S. W., CASTELINO, J. B., PAPPKOFF, H. Biological and binding activities of equine pituitary gonadotrophins and pregnant mare serum gonadotrophin. **Journal of Endocrinology**, v.83, p.311-322, 1979.
- MÉNÉZO, Y., VEIGA, A., BENKHALIFA, M. Improved methods for blastocyst formation and culture. **Human Reproduction**, v.13, suppl. 4, p.256-265, 1998.
- MILLER, B. G., ARMSTRONG, D. T. Superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin cause delayed implantation and infertility in immature rats. **Biology of Reproduction**, v.25, p.253-260, 1981a.
- MILLER, B. G., ARMSTRONG, D. T. Effects of a superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on ovarian function, serum estradiol, and progesterone levels and early embryo development in immature rats. **Biology of Reproduction**, v.25, p.261-271, 1981b.
- MOOR, R. M., OSBORN, J. C., CROSBY, I. M. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.74, p.167-172, 1985.
- MUÑOZ, I., RODRIGUES DE SADIA, C., GUTIÉRREZ, A., BLANQUEZ, M. J., PINTADO, B. Comparison of superovulatory response of mature out bred mice treated with FSH or PMSG and development potential of embryos produced. **Theriogenology** v.41, p.907-914, 1994.
- OZGUNEN, K. T., ERDOGAN, S., MAZMANOGLU, N., PAMUK, I., LOGOGLU, G., OZGUNEN, T. Effect of gonadotrophin dose on oocyte retrieval in superovulated BALB/c mice. **Theriogenology**, v.56, p.435-445, 2001.
- POUEYMIROU, W. T., CONOVER, J. C., SCHULTZ, R. M. Regulation of mouse preimplantation development differential effects of CZB medium and Whitten's medium on rates and patterns of protein synthesis in 2-cell embryos. **Biology of Reproduction**, v.41, p.317-322, 1989.
- RENARD, J. P., BALDACCI, P., RICHOUX-DURANTHON, V., POURNIN, S., BABINET, C. A maternal factor affecting mouse blastocyst formation. **Development**, v.120, p.797-802, 1994.
- SOUZA, P. A., CAVENEY, A., WESTHUSIN, M. E., WATSON, A. J. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. **Theriogenology**, v.49, p.115-128, 1998.
- TARÍN, J. J., ALBALÁ, S. P., PIQUER, V. G., HERMENEGILDO, C., CANO, A. Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotropin injection affects pre-implantation embryo development in vitro in the mouse. **Molecular Reproduction And Development**, v.62, p.312-319, 2002.
- WALTON, E. A., ARMSTRONG, D. T. Ovarian function and early embryo development in immature rats given a superovulatory dose of PMSG, later neutralized by antiserum. **Biology of Reproduction**, v.25, p.272-280, 1981.
- WALTON, E. A., EVANS, G., ARMSTRONG, D. T. Ovulation response and fertilization failure in immature rats induced to superovulate. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.67, p.91-96, 1983.