

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

**JULIANA POLISSENI**

**DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS E DE  
RATAS CULTIVADOS *IN VITRO* EM MEIOS UTILIZADOS EM  
EMBRIÕES HUMANOS**

**JUIZ DE FORA**

**2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

JULIANA POLISSENI

DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS E DE RATAS  
CULTIVADOS *IN VITRO* EM MEIOS UTILIZADOS EM  
EMBRIÕES HUMANOS

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Saúde - Área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde.

**Orientadora:** Profa. Dra. Vera Maria Peters

**Co-orientadora:** Prof. Dra. Martha de Oliveira Guerra

**Co-orientador:** Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

JUIZ DE FORA

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração  
automática da Biblioteca Universitária da UFJF,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Polisseni, Juliana Polisseni.

DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS E DE RATAS CULTIVADOS  
IN VITRO EM MEIOS UTILIZADOS EM EMBRIÕES HUMANOS / Juliana  
Polisseni Polisseni. -- 2013.

149 p.

Orientadora: Vera Maria Peters Peters  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora,  
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde  
Brasileira, 2013.

1. Ratos. 2. Bovinos. 3. Sistema de cultivo sequencial. 4.  
Sistema de cultivo único. 5. Expressão gênica. I. Peters,  
Vera Maria Peters, orient. II. Título.

JULIANA POLISSENI

# DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS E DE RATAS CULTIVADOS *IN VITRO* EM MEIOS UTILIZADOS EM EMBRIÕES HUMANOS

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Saúde - Área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde.

Aprovada em: 14 /05/2013

## BANCA EXAMINADORA

---

**Profa. Dra. Vera Maria Peters (Orientador)**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

**Profa. Dra. Martha de Oliveira Guerra (Co-orientadora)**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

**Dr. Dimas Augusto Carvalho de Araújo**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

**Dr. Wanderlei Ferreira de Sá**  
Embrapa Gado de Leite

---

**Dra. Raquel Varella Serapião**  
Empresa Pesagro – Rio de Janeiro

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”.

Charles Chaplin

## **DEDICATÓRIAS**

Ao meu filho querido Hugo, que me ensinou os verdadeiros e mais puros sentimentos da vida.

Ao Guilherme, companheiro de todas as horas, pelo incentivo, cumplicidade e paciência em todos os momentos.

Aos meus queridos pais Álvaro e Márcia, exemplos de vida e perseverança e pelo apoio nos momentos de dificuldade.

Às minhas irmãs Fernanda e Renata, que sempre me incentivaram.

Aos meus familiares, em especial a Tia Magda, que torceram pelo sucesso do trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e em especial a:

Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora e Embrapa Gado de Leite, por propiciar a estrutura para o desenvolvimento do mesmo.

Profa. Dra. Vera Maria Peters, diretora do Centro de Biologia da Reprodução, minha orientadora, pela dedicação, disponibilidade, paciência e confiança , propiciando a oportunidade de atingir meu objetivo.

Profa. Dra. Martha de Oliveira Guerra, pelo carinho, paciência e disponibilidade em todos os momentos da realização deste estudo..

Dr. Wanderlei Ferreira de Sá, pelo acolhimento desde o primeiro dia de trabalho, confiança e a quem devo grande parte da minha formação.

Dr. Luis Sérgio de Almeida Camargo, pela competência com que me conduzieste trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite: Dr. João Henrique Moreira Viana, Dr. Bruno Campos e Dra. Lilian Tamy Iguma pela significativa contribuição.

Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite pelo auxílio no desenvolvimento prático deste trabalho.

Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, nas pessoas dos técnicos Myro Rodrigues e Joel Vianello, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e as incontáveis idas, de madrugada, ao matadouro de Juiz de Fora.

A pós-graduanda Michele Munck pela amizade e auxílio no desenvolvimento prático da parte de genética molecular deste trabalho.

Aos pesquisadores e todos os funcionários do Centro de Biologia da Reprodução pelo apoio e enriquecedor convívio do dia-a-dia.

Às queridas amigas Raquel Varella Serapião, Carolina Campobiango Quintão, Rúbia Prudêncio pela amizade e cumplicidade presente nas horas difíceis e que tornaram mais suaves os momentos desta caminhada.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, pelo companheirismo e apoio indispensável.

Aos colegas da Embrapa Gado de Leite, Ríbrio, Carolina Marinho, Eliza, Paulo pela disponibilidade e colaboração.

Aos estagiários do Centro de Biologia da Reprodução, João Gabriel, Larissa, Fernanda, Elaine, Rafaela pelo auxílio.

Aos colegas, funcionários e a estagiária Pâmella da Clínica Pró-Criar/Monte Sinai, pelo incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Juiz de Fora, em nome da Profa. Dra. Darcília Maria Nagen da Costa, coordenadora adjunta e de ensino do Programa de Pós-Graduação em Saúde, pela disponibilidade e apoio.

À Embrapa Gado de Leite e Centro de Biologia da Reprodução e Fapemig (APQ – 01749-08, Rede Mineira de Bioterismo e TOXIFAR), que financiaram o trabalho, permitindo a sua realização.

A todos os meus familiares que sempre torceram por essa conquista.

## RESUMO

Objetivou-se avaliar sistemas de cultivo propostos para utilização de embriões humanos: sistema de cultivo único e sistema de cultivo sequencial, comparando com sistema de cultivo utilizado nos modelos experimentais bovino e ratas Wistar. Especificamente avaliou-se taxa de clivagem e blastocisto, cinética do desenvolvimento embrionário, quantificação da expressão dos genes em blastocistos bovinos e avaliação da viabilidade e qualidade por morfologia e Tunel de embriões oriundos de ratas Wistar. Para bovinos, complexos cumulus-oócitos foram maturados, fecundados *in vitro*. No experimento 1 os zigotos foram distribuídos nos sistemas de cultivo: CR2aa, SOFaa, sistema de cultivo seqüencial ECM®/Multiblast® e sistema de cultivo único Global®. Avaliou-se a taxa de clivagem e de blastocisto e expressão dos genes *PRDX*, *HSP70.1*, *GLUT1* e *GLUT5*, nos blastocistos. No experimento 2, o cultivo embrionário foi avaliado sobre o desenvolvimento de embriões bovinos biopsiados. Os zigotos foram distribuídos nos sistemas de cultivo: CR2aa, sistema de cultivo seqüencial G1®/G2® e ECM®/Multiblast®, sistema de cultivo único Global®. Para todos os grupos, os embriões 8-16 células foram biopsiados e retornados para cultivo. Avaliou-se taxa de clivagem e de blastocisto. Para ratas Wistar, utilizou-se animais, do Centro de Biologia da Reprodução (CBR/UFJF), com doze semanas de vida, superovuladas com 150 UI/kg de PMSG e 75 UI/kg de hCG, intraperitonealmente. No experimento 1 a coleta embrionária procedeu-se 24 horas após o hCG e avaliou-se a viabilidade embrionária. No experimento 2 ratas foram distribuídas entre os grupos controle e superovulado e os embriões foram coletados 48 e 72 h após a administração de hCG. Peso dos ovários, número total de estruturas embrionárias e grau de qualidade de embriões foram analisados. No experimento 3 a coleta embrionária procedeu-se 72 h após a administração de hCG. Avaliou-se a qualidade de embriões cultivados *in vitro* oriundos de ratas superovuladas através da taxa de blastocisto e do índice apoptótico. Já no experimento 4 a coleta dos embriões foi realizada 48h após a administração do hCG. Embriões recuperados foram distribuídos aleatoriamente segundo os grupos: sistema de cultivo sequencial ECM®/Multiblast®, sistema de cultivo único Global®, KSOM. Avaliou-se taxa de blastocisto. A análise estatística foi realizada pelo teste do qui-quadrado, teste de Student, ANOVA e a expressão gênica foi analisada com REST®. No experimento 1 bovino as taxas de clivagem foram semelhantes entre os grupos, mas a taxa de blastocisto total foi menor no sistema sequencial e a taxa de blastocisto expandido foi maior no sistema de cultivo único. Além disso, o cultivo de embriões no sistema único resultou em maior expressão de *GLUT1* e *GLUT5* ( $P < 0,01$ ) e níveis de expressão semelhantes de *HSP70.1* e *PRDX1* em comparação com os embriões cultivados em meios sequenciais. No experimento 2 bovino tanto a taxa de clivagem quanto a taxa de blastocisto foi semelhante entre os grupos. Para ratos, no experimento 1 98,2% dos embriões coletados foram considerados viáveis. No experimentos 2 o grupo superovulado apresentou ovários com maior peso e maior número de embriões, comparado com o grupo controle. Entretanto, os embriões do grupo superovulado apresentaram menor número de células 72 horas após a administração de hCG. No experimento 3 a taxa de blastocisto foi de 83,17%, com taxa apoptótica de  $10.32 \pm 8.91\%$ . No experimento 4 a taxa de blastocisto total foi menor em sistema sequencial (13,6%) quando comparado com KSOM (24,0%) e sistema de cultivo único (32,9%)

( $p<0.05$ ). Concluiu-se que o cultivo de embriões em meio único é mais favorável em comparação com a de meios sequenciais, a superovulação foi bem sucedida no modelo rato e a técnica de TUNEL se mostrou viável na avaliação da qualidade embrionária de embriões de ratas Wistar.

**Palavras-chaves:** Bovinos. Ratos. Sistema de cultivo único. Sistema de cultivo sequencial. Expressão gênica. Técnica de Tunel.

## ABSTRACT

The objective was to evaluate culture systems proposed to use in human embryos: single culture system and sequential culture system, compared with culture used in experimental model bovine and Wistar rats. Specifically we evaluated the cleavage and blastocyst rate, embryo kinetics, quantification of gene expression in bovine blastocysts and evaluated the viability and quality by morphology and Tunel of embryos derived from female rats. For bovine cumulus-oocyte complexes were matured, fertilized in vitro. In experiment 1 zygotes were distributed in culture systems: CR2aa, SOFa, sequential culture system ECM®/Multiblast® and single culture system Global®. We evaluated cleavage and blastocyst rate and gene expression *PRDX*, *HSP70.1*, *GLUT1* and *GLUT5* in blastocysts. In experiment 2, the embryo development was evaluated on the development of bovine embryos biopsied. The zygotes were distributed in culture systems: CR2aa, sequential culture system G1®/G2® and ECM®/Multiblast®, single culture system Global®. For all groups, the 8-16 cells embryos were biopsied and returned to culture. We evaluated cleavage and blastocyst rate. For Wistar rats, we used animals of the Center for Biology of Reproduction (CBR/UFJF), with twelve weeks of life and superovulated with 150IU/kg of PMSG and 75 IU/kg hCG intraperitoneally. In experiment 1 the embryo collection proceeded 24 hours after hCG and we evaluated embryo viability. In experiment 2 rats were distributed between the control and superovulated and embryos were collected at 48 and 72 h after hCG administration. Weight of ovaries, the total number of embryonic structures and quality of embryos were analyzed. In experiment 3 embryo collection proceeded to 72 h after hCG administration. We evaluated the quality of embryos cultured in vitro from superovulated rat through the blastocyst rate and apoptotic index. Already in experiment 4 embryo collection was performed 48 h after hCG administration. Embryos recovered were randomized according to the groups: sequential culture system ECM®/Multiblast®, single culture system Global®, KSOM. We evaluated the rate of blastocyst. Statistical analysis was performed using the chi-square test, Student's test, ANOVA and gene expression was analyzed with REST®. In experiment 1 bovine cleavage rate was similar between groups, but the total blastocyst rate was lower in the sequential system and expanded blastocyst rate was higher in single culture system. Furthermore, the embryo cultured in single culture resulted in higher expression of *GLUT1* and *GLUT5* ( $P <0.01$ ) and similar expression levels of *HSP70.1* and *PRDX1* compared to embryos cultured in sequential media. In experiment 2 both cleavage and blastocyst rate was similar between bovine groups. For rats in experiment 1, 98.2% collected embryos were considered viable. In experiments 2 superovulated group showed ovaries with greater weight and greater number of embryos, compared with control group. However, embryos from superovulated group showed smaller number of cells 72 hours after hCG administration. In experiment 3 the blastocyst rate was 83.17%, with  $8.91\% \pm 10.32$  apoptotic rate. In experiment 4 the total blastocyst rate was lower in sequential system (13.6%) compared to KSOM (24.0%) and single culture system (32.9%) ( $p <0.05$ ). It was concluded that the culture of embryos in single medium is more favorable than sequential media, superovulation was successful in a rat model and the TUNEL technique proved feasible in evaluating the quality of embryos from embryonic Wistar rats.

**Keywords:** Bovine. Rats. Single culture system. Sequential culture system. Gene expression. Tunel technique.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Comparação entre a composição dos meios de cultivo comerciais propostos para desenvolvimento de embriões humanos	32
Tabela 2 Classificação morfológica para avaliação da qualidade embrionária	37
Tabela 3. Sequência de Primer e temperatura de anelamento específicas para cada gene avaliado	53
<b>Artigo:</b> <i>Effect of single and sequential culture system on developmental competence and gene expression in bovine embryo</i>	96
Table 1 Primer sequences used for relative gene expression analyses by real-time PCR.	113
Table 2 Distribution of embryos stages at 72h post insemination according to different groups of embryo culture.	114
Table 3 Distribution of blastocyst stages at 192h post insemination, according to different groups of embryo culture.	115
<b>Artigo:</b> <i>Impact of the use of gonadotropins on embryonic development – a rat model.</i>	129
Table 1 Embryo classification system.	138
Table 2 Stage of development of embryos from superovulated and control rats at 48 and 72 hours after hCG treatment.	139
Table 3 Embryo quality grades at 48 and 72 hours after hCG treatment.	140
<b>Artigo:</b> <i>Evaluation of single and sequential media culture systems in two experimental models: bovine and rat</i>	117
Table 1 Development of bovine embryo fertilized in vitro, biopsied at 8-16 cell embryos and cultured in different medium	127
Table 2 Distribution of rat embryos 120 hours of culture at different stages of blastocyst	128

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 A Classificação pronúcleo segundo dispersão nucléolo.	34
Figura 1 B Foto ilustrativa ovócito humano fertilizado – pronúcleo humano – padrão Z1.	34
Figura 2 Figura ilustrativa dos estádios de desenvolvimento embrionário: A - embrião no estádio de duas células; B - embrião no estádio de quatro células; C - embrião no estádio de oito células; D - embrião no estádio de mórula; E - embrião no estádio de blastocisto.	36
Figura 3 Figura ilustrativa da avaliação da qualidade embrionária: grau I; grau II; grau III; grau IV; grau V.	37
Figura 4 Imagem blastocisto bovino, onde os blastômeros íntegros apresentam-se corados por solução de DAPI (azul), e os blastômeros fragmentados apresentam-se corados de verde.	39
Figura 5 Ilustração processo de coleta, lavagem e punção de ovários obtidos em matadouro. A - transporte dos ovários do matadouro ao laboratório da Embrapa; B - lavagem dos ovários anterior a aspiração; C - aspiração dos ovários.	48
Figura 6 Processo de seleção e maturação ovocitária: A - ovócitos aspirados mantidos em cálice para decantação; B - seleção de COC's com citoplasma homogêneo e três ou mais camadas de células do <i>cumulus</i> ; C - ovócitos maturados – aspecto expandido das células do <i>cumulus</i> .	49
Figura 7 Fertilização <i>in vitro</i> : A - preparo do sêmen pela técnica de <i>swim up</i> ; B - fertilização dos COC's; C – estufa incubadora onde manteve-se todas as técnicas <i>in vitro</i> .	50
Figura 8 Biópsia de embriões no terceiro dia após a fecundação: A – fixação do embrião; B – introdução da micropipeta de biópsia; C – embrião pós-biópsia e blastômeros retirados com a realização da técnica (seta)	51
Figura 9 A - avaliação taxa de clivagem e proporção dos embriões em diferentes estádios de desenvolvimento; B - avaliação da taxa de blastocisto e proporção dos embriões em diferentes estádios de blastocisto.	52

Figura 10 Aparelho de PCR em tempo real – <i>ABI Prism 7300 Sequence Detection System</i> .	55
Figura 11 A – gaiolas de polipropileno onde os animais ficaram acondicionados; B – estante climatizada onde as gaiolas ficaram dispostas.	60
Figura 12 A – ovidutos, ovários e cornos uterinos dissecados e removidos em bloco com a vagina; B – ovário e oviduto em placa de petri; C – coleta dos embriões.	61
Figura 13. Avaliação de embriões de ratas Wistar em diferentes estádios de desenvolvimento: A – embrião com duas células grau I; B – embrião com quatro células grau I; C – embrião com sete células grau I.	62
Figura 14 Blastocisto corado: A – coloração dos blastômeros pelo DAPI e visualizados no filtro 460nm; B – células em apoptose identificadas pela fluorêsceína através do filtro 520±20nm	63
Figura 15. Avaliação de embriões de ratas Wistar em diferentes estádios de blastocisto: A – blastocisto; B – blastocisto expandido	64
<b>Artigo:</b> <i>Effect of single and sequential culture system on developmental competence and gene expression in bovine embryo</i>	96
Figure 1: Comparations of relative of transcripts in embryos cultured in SOFaa, single and sequential system. (A): CR2aa vs SOFaa. (B): CR2aa vs sequential system. (C): CR2aa vs single system. (D): SOFaa vs single system. (E) SOFaa vs sequential system (F) Single system vs sequential system. Columns with (*) for the same gene differ between treatments ( $p<0.05$ )	116
<b>Artigo:</b> <i>Impact of the use of gonadotropins on embryonic development – a rat model</i>	129
Figure 1 Average weight of ovaries in grams from the superovulated and control group. Student's test showed significant between group difference ( $p<0.001$ )	141
<b>Artigo:</b> <i>Técnica de TUNEL em embriões de ratas Wistar: avaliação da qualidade e da capacidade de desenvolvimento dos embriões</i>	142
Figura 1 Blastocisto corado A – Coloração dos blastômeros pelo DAPI e visualizados no filtro 460nm. B – Células em apoptose identificadas	143

pela fluorescência através do filtro  $520\pm20\text{nm}$ . C – Embrião em que a enzima do TUNEL foi omitida, não observando sinal fluorescente.

## LISTA DE QUADROS

**Artigo:** *Técnica de TUNEL em embriões de ratas Wistar: avaliação da qualidade e da capacidade de desenvolvimento dos embriões*

Quadro 1 Número total de estruturas coletadas (N) e embriões em diferentes estádios de desenvolvimento: mórulas (MOR), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl), blastocisto expandido (Bx) e esruturas degeneradas (DEG) após cultivo por 48 horas de embriões de ratas wistar superovuladas

144

Quadro 2 Número total de blastômeros, número de embriões apoptóticos e taxa de apoptose em embriões de ratas avaliados através da técnica de túnel.

144

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	19
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	21
<b>2.1 Técnicas de Reprodução Assistida</b>	21
<b>2.1.1 Hiperestimulação</b>	21
<b>2.2 Requisitos para o cultivo embrionário <i>in vitro</i></b>	24
<b>2.3 Meios de Cultivo</b>	25
<b>2.3.1 Sistema de cultivo sequencial</b>	26
<b>2.3.2 Sistema de cultivo único</b>	26
<b>2.3.3 Composição dos meios de cultivo</b>	28
<b>2.3.4 Interferentes dos meios de cultivo</b>	30
<b>2.4 Critérios morfológicos para seleção embrionária</b>	33
<b>2.4.1 Avaliação morfológica do zigoto em estádio de dois pronúcleos (2PN)</b>	34
<b>2.4.2 Desenvolvimento embrionário e morfologia</b>	35
<b>2.5 Outros métodos para avaliação da qualidade embrionária</b>	37
<b>2.5.1 Dosagem de marcadores bioquímicos</b>	38
<b>2.5.2 Diagnóstico genético pré-implantação (DGPI)</b>	38
<b>2.5.3 Técnica de túnel para avaliação da qualidade embrionária</b>	39
<b>2.5.4 Expressão gênica</b>	40
<b>2.5.4.1 Técnica de Polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR)</b>	43
<b>3 MODELO EXPERIMENTAL</b>	45
<b>4 HIPÓTESES</b>	46
<b>5 OBJETIVOS</b>	47
<b>5.1 Objetivo Geral</b>	47
<b>5.2 Objetivos Específicos</b>	47
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS</b>	48
<b>6.1 Estudos com embriões bovinos</b>	48
<b>6.1.1 Obtenção de embriões bovinos</b>	48
<b>6.1.1.1 Coleta de ovários e seleção dos ovócitos</b>	48
<b>6.1.1.2 Maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos</b>	49
<b>6.1.1.3 Fertilização <i>in vitro</i> dos ovócitos</b>	49
<b>6.1.1.4 Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões</b>	50
<b>6.1.1.5 Biópsia embrionária</b>	50

6.1.1.6 Avaliação do desenvolvimento embrionário	51
6.1.1.7 Expressão Gênica - Quantificação dos transcritos	52
6.1.1.7.1 Extração de RNA e Transcrição Reversa	52
6.1.1.7.2 Quantificação de transcritos pelo RT-PCR	54
6.1.1.8 Análise estatística	55
<i>6.1.2 Delineamento experimental bovinos</i>	55
6.1.2.1 Experimento 1. Avaliação do desenvolvimento e qualidade embrionária de embriões bovinos em sistema de cultivo sequencial e único utilizados para humanos	55
6.1.2.1.1 Organograma experimento 1 bovino	57
6.1.2.2 Experimento 2. Avaliação do desenvolvimento embrionário de embriões bovinos biopsiados em sistema de cultivo sequencial e único utilizados para humanos	58
6.1.2.2.1 Organograma experimento 2 bovino	59
<b>6.2 Estudos com embriões de ratas</b>	60
<i>6.2.1 Obtenção de embriões de ratas</i>	60
6.2.1.1 Animais	60
6.2.1.2 Superovulação	60
6.2.1.3 Experimento 1.A superovulação é eficaz para estimular a foliculogênese e a ovulação <i>in vivo</i> ?	61
6.2.1.4 Experimento 2: A superovulação afeta o desenvolvimento embrionário?	61
6.2.1.5 Experimento 3: Avaliação da qualidade e da capacidade de desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões de ratas Wistar	62
6.2.1.6 Experimento 4: O sistema de cultivo influencia no desenvolvimento embrionário?	64
6.2.1.7 Análise estatística	65
<i>6.2.2 Delineamento experimental ratos</i>	65
6.2.2.1 Experimento 1. A superovulação é eficaz para estimular a foliculogênese e a ovulação <i>in vivo</i> ? – Organograma experimento 1	65
6.2.2.2 Experimento 2. A superovulação afeta o desenvolvimento inicial dos embriões? – Organograma experimento 2	66
6.2.2.3 Experimento 3. Avaliação da qualidade e da capacidade de	66

desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões de ratas Wistar – Organograma experimento 3	
6.2.2.4 Experimento 4. O sistema de cultivo influencia no desenvolvimento embrionário? – Organograma experimento 4	67
<b>6.3 Termo de Aprovação e compromisso da agência financiadora</b>	68
<b>7 RESULTADOS</b>	69
<b>7.1 Artigo bovinos</b>	69
7.1.1 Trabalho submetido para publicação <i>Theriogenology</i> – 2013	69
7.1.2 Abstract publicado na revista <i>Fertility Sterility</i> – 2012	71
7.1.3 Abstract publicado no Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida - 2012	72
7.1.4 Trabalho submetido ao Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida - 2013	74
<b>7.2 Artigo ratos</b>	76
7.2.1 Trabalho aceito para publicação no Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida – 2013	76
7.2.2 Trabalho publicado na revista <i>Interdisciplinar de Estudos Experimentais</i>	78
<b>8 COMENTÁRIOS GERAIS</b>	79
<b>8.1 Modelo experimental bovino</b>	79
<b>8.2 Modelo experimental rato</b>	80
<b>9 CONCLUSÕES</b>	81
<b>10 REFERÊNCIAS</b>	82
<b>11 APÊNDICE</b>	96
11.1 Artigo submetido para publicação <i>Theriogenology</i> – 2013	96
11.2 Artigo submetido para publicação no Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida – 2013	117
11.3 Artigo aceito para publicação no Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida – 2013	129
11.4. Artigo publicado na revista <i>Interdisciplinar de Estudos Experimentais</i> – 2009	142
11.5 Abstract publicado na <i>Fertility Sterility</i> – 2012	145
11.6 Abstract publicado no Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida – 2012	147

## 1 INTRODUÇÃO

As Técnicas de Reprodução Assistida (TRA's) têm sido amplamente utilizadas, gerando centenas de embriões. Apesar da manipulação *in vitro* ser utilizada há décadas, a proporção de zigotos que se desenvolvem até o estádio de blastocisto ainda é cerca de 30-40% (FEUGANG; CAMARGO-RODRIGUEZ; MEMILI, 2009). Isso se deve à multiplicidade de fatores, como os efeitos da estimulação ovariana por hormônios gonadotróficos utilizados nos programas de reprodução assistida, no desenvolvimento embrionário subsequente (YOUNIS et al., 2012), além das condições inadequadas de cultivo que não permitem ao embrião preservar sua homeostase, promovendo, em curto prazo, alterações na morfologia, proliferação celular, apoptose, metabolismo e, a médio e longo prazo, baixa taxa de gravidez, maior risco de aborto, anomalias congênitas, morte pós-natal e doenças na idade adulta (HENTEMANN; MOUSAVI; BERTHEUSSEN, 2010).

Diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para aumentar o sucesso no cultivo de embriões de mamíferos. Atualmente, existem inúmeros meios comerciais disponíveis para embriões humanos, sejam eles sequenciais, ou seja, elaborados com o intuito de suprir as diferentes necessidades do embrião de acordo com seu estádio de desenvolvimento ou denominados sistema único, no qual todos os componentes necessários ao desenvolvimento embrionário já estariam disponíveis desde o início do desenvolvimento (LANE et al., 2003).

Entretanto, até o momento, não há informação suficiente para identificar o sistema de cultivo ideal, porque a maioria dos estudos que avalia os efeitos dos meios de cultivo, leva em consideração somente a porcentagem de embriões que atingem o estádio de blastocisto. Embora seja razoável usar esse ponto final de desenvolvimento como marcadores de eficácia de sistemas de cultivo, é provável que em alguns casos, os efeitos de uma dada cultura possa não manifestar-se na morfologia do embrião, alterando sua ultra-estrutura, sendo necessários estudos a nível molecular (OLIVEIRA; LOPES; RODRIGUES, 2005). Desde então, genes facilitadores de glicose *GLUT1* e *GLUT5* e genes relacionados ao estresse oxidativo *HSP70.1*, *PRDX1* vêm sendo associados à qualidade do embrião produzido *in vitro* (BERTOLINI et al., 2002, FEUGANG; CAMARGO-RODRIGUEZ; MEMILI, 2009). As proteínas de choque térmico (*HSPs*) e peróxido (*PRDX*), por exemplo, estão

intimamente associadas a respostas celulares do estresse causado por condições inadequadas do cultivo (OLIVEIRA; LOPES; RODRIGUES, 2005). Entretanto os facilitadores do transporte de glicose 1 e 5 (*GLUT 1 e 5*) desempenham um papel importante no fornecimento de substratos metabólicos em mamíferos e sabe-se que alterações no transporte, na captação de glicose e metabolismo, nas primeiras fases do desenvolvimento, podem afetar o desenvolvimento fetal (PURCELL; MOLEY, 2009; TONACK et al., 2009).

Acredita-se que através de um estudo dinâmico, interligando a cinética do desenvolvimento embrionário e o estudo epigenético, por meio da avaliação da expressão gênica dos embriões, seria possível aumentar o sucesso das técnicas de reprodução assistida (DELHANTY; HANDYSIDE, 1995; HILL, 2004; VERLINSKY et al., 2004).

Este estudo objetivou avaliar sistemas de cultivo propostos para utilização de embriões humanos: sistema de cultivo único (Global<sup>®</sup> – LifeGlobal<sup>®</sup>) e sistema de cultivo sequencial (ECM<sup>®</sup>/Multiblast<sup>®</sup> - Irvine<sup>®</sup>, G1<sup>®</sup>/G2<sup>®</sup> - Vitrolife), comparando com os sistemas de cultivo utilizados rotineiramente para os modelos experimentais bovino (CR2aa/SOFaa) e ratas Wistar (KSOM). Avaliou-se avaliou-se, em embriões bovinos, taxa de clivagem, taxa de blastocisto em embriões íntegros e biopsiadados, cinética do desenvolvimento embrionário, quantificação da expressão de diferentes genes em blastocisto bovinos: *HSP70.1*, *PRDX1*, *GLUT1* e *GLUT5*. Em embriões de ratas foi avaliada a viabilidade da técnica de superovulação, além da qualidade de embriões por morfologia e número de células apoptóticas, através da técnica de Tunel. Também se avaliou taxa de blastocisto.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Técnicas de Reprodução Assistida – TRA's

A possibilidade de cultura do ovócito foi reconhecida no final do século dezenove, mas somente no início de 1930 utilizaram-se modelos animais (camundongos e ratos) para realização de cultura de ovócitos e capacitação espermática. Resultados positivos obtidos com fertilização e formação de zigotos permitiram a transferência de embriões para o útero, contribuindo para o estabelecimento da técnica (FRANCO JUNIOR; BARUFI; MAURI, 2004). Mais tarde, métodos de coleta ovular foram propostos, enfatizando a vantagem do acompanhamento ultrassonográfico.

Ao longo da evolução da Reprodução Assistida, o conhecimento da dinâmica folicular e o uso de gonadotrofinas permitiram o estabelecimento de diversos protocolos de estimulação ovariana e multiovulação. A supressão do hormônio endógeno luteinizante (LH) se tornou necessária nos protocolos de indução. Esquemas envolvendo longo tempo de supressão de LH, iniciando-se no estágio folicular do ciclo anterior foram denominados protocolos longos e, outros, que seriam iniciados no mesmo ciclo, foram denominados *Flare up* ou curto (CAMARGOS; MELO, 2001; PASSOS, 2004).

O nascimento de Louise Brown, em 1978, na Inglaterra foi o marco inicial do sucesso das Técnicas de Reprodução Assistida (TRA). Nas duas décadas que se seguiram houve acelerado progresso científico com o desenvolvimento de técnicas laboratoriais complexas (EDWARDS; BRODY, 1995).

Entretanto, a grande incidência nas falhas da fertilização e baixas taxas de implantação (5 a 30%) parecem estar associadas, em parte, a hiperestimulação e as condições inadequadas do cultivo que não permitem ao embrião preservar sua homeostase, promovendo anormalidades gaméticas ou erros cromossômicos durante a embriogênese (PETERSON, 2004).

#### 2.1.1 Hiperestimulação

Nos mamíferos, o ovário contém um grande número de folículos imaturos latentes, os quais são estabelecidos na vida intra-uterina. Um fenômeno

denominado recrutamento natural elimina os folículos por meio de atresia, o qual independe da ação das gonadotrofinas. Já durante a vida reprodutiva, gonadotrofinas hipofisárias, esteróides ovarianos e hormônios peptídicos cooperaram para garantir o crescimento e desenvolvimento dos folículos ativados. Um único folículo dominante eventualmente emerge, ovula, e, em seguida, permite a ativação do próximo grupo de folículos (WU; XU; WANG, 2007; WOODRUFF; SHEA, 2011). Após a menarca de um ciclo espontâneo, para cada 700 a 800 folículos atresiados, um poderá atingir a maturidade e ovular sob ação das gonadotrofinas.

Para programa de reprodução assistida, é preciso criar um estado de hiperovulação com recrutamento, seleção e dominância de uma quantidade maior de folículos ovarianos, otimizando um protocolo capaz de obter óvulos e embriões de boa qualidade, maximizando as taxas de implantação/gravidez e minimizando suas complicações (BATISTA; BATISTA; LIMA, 2010).

O tratamento com gonadotrofinas exógenas consiste em gonadotrofinas que atuam na indução do crescimento de folículos múltiplos, seguido de gonadotropina coriônica humana (hCG), a qual promove a maturação dos oócitos e a ovulação (COMBELLES; ALBERTINI, 2003; KAGABU; UMEZU, 2006).

Diferentes preparações que contém FSH são utilizadas no ciclos de estimulação da ovulação para TRA, já que folículos antrais com diâmetro a partir de 2 a 5 mm contêm receptores ao FSH. As quatro formas comumente utilizadas são:

- HMG urinário (HMG), que contém FSH e LH de origem urinária;
- FSH urinário (FSH-u), que contém predominantemente FSH de origem urinária;
- FSH recombinante (FSH-r), que contém apenas FSH;
- LH recombinante (LH-r), que contém apenas LH.

O pico de LH no final da foliculogênese tem uma importante função na ativação da meiose ovocitária, liberando após 36 horas um ovócito maduro em metáfase II, capaz de ser fertilizado pelo espermatozóide. Portanto, nos ciclos de TRA a hipófise está bloqueada, não havendo a possibilidade do pico espontâneo do LH. Então, quando a estimulação da ovulação com gonadotrofinas promover a presença de dois a três folículos entre 18 e 20mm utiliza-se a gonadotrofina coriônica humana (hCG) que é um hormônio glicoproteico gonadotrófico produzido principalmente pela placenta, e é utilizado na maturação final dos ovócitos (BATISTA; BATISTA; LIMA, 2010).

É importante salientar que a resposta ovulatória é variável entre as pacientes, sendo necessário avaliar fatores preditivos da resposta ovariana, decidindo o melhor protocolo e a dose adequada de gonadotrofina a ser utilizada, como se segue:

- **Fatores demográficos:** idade, raça, peso, índice de massa corpórea (IMC);
- **Fatores clínicos:** idade da menarca, duração da infertilidade, fumo, álcool, duração do ciclo;
- **Fatores endócrinos** (fase folicular inicial): valores no terceiro dia do ciclo de FSH, LH, inibina B, testosterona, progesterona, hormônio antimülleriano (AMH);
- **Ovarianos:** volume ovariano, contagem basal de folículos antrais;

Além disso, ainda há controvérsias sobre os efeitos da estimulação ovariana por hormônios gonadotróficos no desenvolvimento embrionário subsequente. A estimulação por gonadotrofina parece ter um impacto direto sobre marcadores de estresse oxidativo, induzindo a produção de radicais livres e, eventualmente, reduzindo a taxa de concepção (YOUNIS et al., 2012). As condições ótimas necessárias para a implantação do embrião também se alteram após a estimulação do ovário, possivelmente devido a mudanças na coordenação da foliculogénese e oogénese (COMBELLES; ALBERTINI, 2003; ZIEBE et al., 2004; SOTOMARU; KAMISAKO; HIOKI, 2005; GHAEMI; SALAHNIA; VALOJERDI, 2008). Isso porque o aumento do número de estruturas no trato reprodutivo feminino coloca uma maior exigência sobre os nutrientes disponíveis para o desenvolvimento embrionário inicial (GHAEMI; SALAHNIA; VALOJERDI, 2008). O aumento das taxas de aneuploidia nos embriões também foi correlacionado com a estimulação ovocitária (VERBERG et al., 2009). Recentemente, pesquisadores demonstraram uma associação entre ácidos graxos livres e resposta ovariana à gonadotrofinas em mulheres submetidas a TRA. O aumento de ácidos graxos vem sendo associado com decréscimo da função folicular ovariana e qualidade dos ovócitos, e subsequentemente, baixas taxas de implantação do embrião (CHUANG et al., 2010; YOUNIS et al., 2012).

Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer se o uso de hormônios gonadotróficos em TRA's tem efeito sobre o desenvolvimento do embrião (CHUANG et al., 2010, SANTOS; KUIJK; MACKLON, 2010, YOUNIS et al., 2012).

## 2.2 Requisitos para o cultivo embrionário *in vitro*

De uma maneira geral, para o embrião sobreviver e se desenvolver no cultivo *in vitro* é necessário que os meios de cultivo preencham duas funções: contenham os componentes necessários para sobrevivência ou permitam, através dos componentes disponíveis, a síntese de outros componentes indispensáveis para o desenvolvimento do embrião (SUMMERS; BIGGERS, 2003).

Até o momento, o que se observa é que os embriões cultivados *in vitro* ainda apresentam qualidade morfológica e fisiológica inferiores aos produzidos *in vivo*: os blastômeros são mais escuros, as uniões celulares são anormais e o número de células totais nos blastocistos parece ser menor. As alterações ultraestruturais observadas com mais frequência são redistribuição de organelas na região cortical e agregação citoplasmática, vacuolização e rompimento da membrana e/ou matriz mitocondrial, culminando no processo de apoptose e morte celular (LI et al., 2000).

As alterações observadas se devem, aos meios de cultivo que podem influenciar na cinética de desenvolvimento inicial (KHURANA; NIEMANN, 2000; DODE; RUMPF, 2002), expressão gênica e envolver alterações no percentual de ácidos graxos da membrana lipídica, bem como a inibição da síntese de substâncias antioxidantes (AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; PAULA-LOPES et al., 2003).

Já foram identificados vários genes com expressão alterada em embriões bovinos e de ratos cultivados *in vitro*, tais como genes ligados a apoptose e ao estresse térmico e oxidativo (*HSP70.1*, *BAX*, *PRDX* e *SOX*) (PEDERSEN et al., 2005; BALASUBRAMANIAN et al., 2007; SAGIRKAYA et al., 2007; WARZYCH et al., 2007) e ao transporte de glicose (*GLUT1* e *GLUT5*) (WRENZYCKI; HERRMANN; NIEMANN, 2007).

Tendo em vista os diversos efeitos dos meios de cultivo sobre o desenvolvimento embrionário mais estudos são necessários com o intuito de melhorar a qualidade do blastocisto produzido por TRA (WRENZYCKI; HERRMANN; NIEMANN, 2007), que estaria diretamente relacionada ao meio de cultivo no qual se desenvolve.

### 2.3 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo para embriões humanos vêm se desenvolvendo a mais de uma década, aumentando significativamente a viabilidade dos embriões cultivados *in vitro*, e é considerado um dos fatores determinantes para qualidade do blastocisto (KHURANA; NIEMANN, 2000; DODE; RUMPF, 2002; FEUGANG, CAMARGO-RODRIGUEZ, MEMILI, 2009).

O pioneirismo na utilização do meio de cultivo biológico coube a Lewis e colaboradores (1911 apud SUMMERS; BIGGERS, 2003), os quais cultivaram tecido embrionário de galinha. A utilização dos meios de cultivo definido acelerou-se em 1940 com a publicação da composição de meio para cultivo de células de planta e de células animais (WHITE, 1946 apud SUMMERS; BIGGERS, 2003). Durante os anos seguintes, um grande número de meios definidos foi introduzido, sendo estudado, principalmente, o cultivo de embriões de mamíferos em coelhos e roedores (BIGGERS et al., 1967 apud SUMMERS; BIGGERS, 2003).

Ao longo de anos de estudo e com maior entendimento dos requerimentos fisiológicos necessários para o desenvolvimento do embrião, desde o estádio de zigoto a blastocisto, conduziu-se o desenvolvimento dos meios de cultivo complexo, ou seja, com mais de doze componentes.

Atualmente, existem inúmeros meios comerciais disponíveis para embriões humanos, sejam eles sequenciais, ou seja, elaborados com o intuito de suprir as diferentes necessidades do embrião de acordo com seu estádio de desenvolvimento ou denominados sistema único, no qual todos os componentes necessários ao desenvolvimento embrionário já estariam disponíveis desde o início do desenvolvimento (LANE et al., 2003). Verifica-se, portanto, que apesar de vários componentes serem comuns aos meios de cultivo, estes apresentam diferenças significantes entre si (Tabela 1).

É importante ressaltar que apesar de comprovada às modificações estruturais sofridas pelo embrião, durante cultivo *in vitro*, ainda não se sabe qual o sistema de cultivo ideal (LI et al., 2000; PEDERSEN et al. 2005, WRENZYCKI; HERRMANN; NIEMANN, 2007).

### 2.3.1 Sistema de cultivo sequencial

Através do estudo do fluido tubário e uterino humano, foi possível observar variações nas concentrações dos carboidratos, dos quais o piruvato e lactato apresentaram-se superiores na região da ampola do oviduto, quando comparado com o útero durante a fase luteal. Em contraste, a concentração da glicose mostrou-se consideravelmente menor na ampola do oviduto (REZK; HUFF; RIZK, 2004; BAUMANN et al., 2007). A partir destas constatações uma abordagem básica foi utilizada para se definir este tipo de meio de cultivo: “retornar ao natural”.

A vertente “retornar ao natural” acredita que o meio de cultivo deva ser o mais próximo possível do ambiente do fluido tubário e uterino, levando-se em consideração as variações nas concentrações dos componentes, dependendo do estádio de desenvolvimento e o compartimento que o embrião se encontraria *in vivo* (VAN LANGENDONCKT et al., 2001). Essas observações foram à base para a introdução do sistema de cultivo denominado estádio-específico ou sequencial, criado por Gardner em 1994, onde dois meios são designados para variar as concentrações dos carboidratos, refletindo a diferença na composição dos componentes do fluido no oviduto e no útero. Então, para suportar o desenvolvimento do zigoto a oito células foram incluídos no meio de cultivo lactato, aminoácidos não essenciais e piruvato.

Subsequentemente, um segundo meio mais complexo é utilizado para a manutenção do desenvolvimento, depois da ativação do genoma embrionário, até a fase de blastocisto. Neste último, glicose e aminoácidos essenciais e não essenciais, vitaminas e precursores de ácidos nucleicos estão presentes (GARCIA-GARCIA et al., 2007).

A eficiência do sistema de cultivo sequencial parece estar relacionada com a diminuição do acúmulo de subprodutos do metabolismo como a amônia no meio de cultivo, o que, consequentemente, aumenta a qualidade do embrião e reduz a possibilidade de aberrações cromossômicas (LANE et al., 2003).

### 2.3.2. Sistema de cultivo único

Outra vertente estudada, denominada “deixe o embrião decidir”, acredita que todos os componentes deveriam estar disponíveis em um único meio desde o início

do desenvolvimento e o metabolismo embrionário é que iria decidir a utilização dos mesmos no momento que julgasse necessário (BIGGERS, 2001). A partir dessa ideia surgiu o sistema de cultivo único, constituído por substâncias previamente conhecidas como aminoácidos, macromoléculas (ácido hialurônico), fatores de crescimento e suplementos sintéticos, reunidos em um único meio de cultivo, utilizado no desenvolvimento de embriões desde o estádio de zigoto a blastocisto (HOSHI, 2003; CORREA et al., 2007).

É importante ressaltar que as concentrações dos componentes deste tipo de meio de cultivo foram determinadas de uma forma funcional enquanto que as concentrações dos componentes do meio de cultivo sequencial foi baseada em fluidos do oviduto e útero, o que pode não ser ótimo para desenvolvimento *in vitro* (SEPULVEDA et al., 2009).

Segundo Reed e colaboradores (2009), a justificativa para maior eficiência do sistema de cultivo único está correlacionada com a redução do risco de perda embrionária e/ou introdução de contaminantes, e consequentemente, de estresse embrionário. Isso porque o cultivo único é menos exposto a mudanças de temperatura e pH, pelo menor número de manipulações dos embriões, que ocorre quando se utiliza o sistema de cultivo sequencial. Além disso, a presença dos 20 aminoácidos durante todo o cultivo, poderia favorecer uma vantagem significativa para o desenvolvimento do embrião.

Em contrapartida, alguns estudos vem questionando o uso de aminoácidos essenciais por mais de 96 horas no cultivo embrionário. Isso porque poderiam provocar parada no desenvolvimento embrionário, atribuída a acúmulo de amônia no meio de cultivo produzido pela deaminação dos mesmos (BIGGERS, 2001; REZK; HUFF; RIZK, 2004).

A fim de exemplificar os sistemas de cultivo descritos, a tabela 1 apresenta os componentes químicos presentes nos meios de cultivo propostos para utilização de embriões humanos, utilizando-se de sistemas de cultivo sequenciais G1<sup>®</sup>/G2<sup>®</sup> - Vitrolife; ECM<sup>®</sup>/Multiblast<sup>®</sup> - Irvine<sup>®</sup>, Global<sup>®</sup> - Lifeglobal<sup>®</sup>, sendo o primeiro meio (G1<sup>®</sup> e ECM<sup>®</sup>) utilizado no estádio de zigoto a oito células e o meio subsequente (G2<sup>®</sup> e Multiblast<sup>®</sup>) em embriões de oito células a blastocisto (LANE et al., 2003; SEPULVEDA et al., 2009) e sistema de cultivo único Global<sup>®</sup>, utilizado durante todo o desenvolvimento embrionário, até o estádio de blastocisto (SEPULVEDA et al., 2009; REED et al., 2009).

### 2.3.3 Composição dos meios de cultivo

Os constituintes químicos dos meios de cultivo estão descritos abaixo:

- **Íons solúveis:** constituintes químicos mais abundantes presentes nos meios de cultivo e contribuem largamente para manutenção da osmolaridade dos mesmos. Estão presentes na forma de sais: NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub> e possuem funções distintas. O cálcio age através de proteínas bombeadoras, canais iônicos e proteínas ligantes, e regula diferentes processos intracelulares, como a reativação do ovócito, levando-o a finalizar sua meiose e participa da ativação do genoma embrionário (TESARIK, 2005). Além disso, é responsável pela modulação do metabolismo energético, coordenando a atividade mitocondrial das células (VAN BLERKOM, 2004). O cálcio também tem função importante na junção célula-célula, compactação e coordenação entre os blastômeros. Outros íons, como Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, estão envolvidos na formação do potencial de membrana das células e controle da osmolaridade celular. O íon fosfato (PO<sub>4</sub>)<sup>2-</sup> tem participação direta no metabolismo energético como precursor do ATP, e pode ainda estar relacionado à síntese de macromoléculas e ao controle de diversos processos celulares: fosforilação de proteínas envolvidas em várias etapas do metabolismo, fosforilação/desfosforilação no controle do ciclo celular e consequentemente, da rede de reações em que o íon fosfato está envolvido. Deve-se ainda destacar o papel dos íons H<sup>+</sup> no metabolismo embrionário para manutenção do pH intracelular, em que as células utilizam um sistema tampão baseado na conversão de íons H<sup>+</sup> e do CO<sub>2</sub> em íon<sub>s</sub> bicarbonato (HCO<sub>3</sub>)<sup>-</sup> (COELHO et al., 2006).

- **Carboidratos:** são utilizados como fontes energéticas (piruvato, lactato e glicose) e estão presentes nos meios de cultivo descritos variando, somente, a concentração em que se apresentam em cada meio. A produção de energia após a fertilização fica restrita ao uso de piruvato, um subproduto da glicólise que é diretamente convertido em acetil-coenzima A e utilizado no ciclo de Krebs (BIGGERS et al., 1967 apud SUMMERS; BIGGERS, 2003), tornando-se componente fundamental dos meios de cultivo na primeiras divisões mitóticas dos mamíferos. Após o estádio de duas células, embriões de algumas espécies já são capazes de utilizar o lactato como fonte de energia (WHITE, 1946 apud SUMMERS; BIGGERS, 2003). Lane e Gardner (2000) sugeriram que as diferenças encontradas na utilização de piruvato ou lactato nos diferentes estádios de desenvolvimento

embrionário se devem a diferenças na regulação de lactato desidrogenase (LDH), a qual catalisa a oxidação do lactato por uma molécula NAD<sup>+</sup> levando à formação de piruvato e NADH (e vice-versa), permitindo à célula obter piruvato a partir de uma única reação. A partir do estádio de oito células a via glicolítica que permite a utilização da glicose já está plenamente estabelecida, uma vez que o genoma embrionário já está ativado, sendo observado aumento no consumo de glicose durante a compactação e no estádio de blastocisto (LEESE et al., 1993).

- **Aminoácidos:** são divididos em duas categorias, os não essenciais, presentes desde o início do cultivo os quais aumentam a velocidade de formação da blastocele e rompimento da zona pelúcida e os essenciais, os quais são acrescentados ao cultivo, no sistema sequencial, a partir do estádio de oito células os quais estimulam a velocidade de clivagem e aumentam o desenvolvimento da massa celular interna (IMC) do blastocisto. Apresentam múltiplas funções entre as quais se podem citar a capacidade de serem precursores de biossíntese, fontes de energia, reguladores do metabolismo energético, osmólito orgânico, tampão para pH intracelular, antioxidantes, além de quelantes para metais pesados e reguladores da diferenciação celular (NAGY; GRECO, 2010). Apesar desta variedade de funções exercidas no metabolismo celular, quando se trata de metabolismo embrionário pré-implantação, muitas dúvidas ainda são observadas a respeito do exato papel de alguns aminoácidos. Atualmente existe consenso entre a presença de aminoácidos no meio de cultivo e ao aumento na qualidade embrionária associada (maior número de células na massa celular interna, além de maior organização da matriz extracelular) (BIGGERS, 2001). Em contrapartida, foi observado, em cultivos extensivos por mais de 96 horas, inibição do desenvolvimento embrionário na presença de aminoácidos essenciais, atribuído a acúmulo de amônia no meio produzido pela deaminação dos mesmos (BIGGERS, 2001; REZK; HUFF; RIZK, 2004).

Recentemente, os aminoácidos taurina, glicina e glutamina foram incorporados ao meio de cultivo com o intuito de agir como osmólito orgânico, com a finalidade de diminuir a concentração de amônia do meio (REZK; HUFF; RIZK., 2004; GARCIA-GARCIA et al., 2007). Entretanto, Lane e Gardner, (1994) sugeriram que a L-glutamina pode causar retardos no desenvolvimento dos embriões. Observou-se, então que a substituição da L-glutamina nos meios de cultura por L-alanyl-L-glutamina, e mais recentemente por glicil-L-glutamina, causa aumento na

qualidade embrionária (BIGGERS; MCGINNIS; SUMMERS, 2004; SUMMERS et al., 2005), já que estes dipeptídeos são metabolizados diretamente pelo embrião, evitando o efeito da degradação da glutamina e consequente acúmulo de subprodutos como a amônia (NAGY; GRECO, 2010).

- **Vitaminas e macromoléculas**, como ácido lipólico e ácido hialurônico: vêm sendo associadas a significante melhora na qualidade embrionária dos blastocistos quando cultivados em meios que as contenham como, por exemplo, o sistema de cultivo sequencial, (NAGY; GRECO, 2010), demonstrado na tabela 1.

- **Quelantes**: o EDTA e a transferrina, por exemplo, estão sendo adicionados em diferentes meios de cultivo pela função de agir como quelantes de íons metálicos. Por outro lado, sugere-se que o EDTA possa reduzir a atividade glicolítica e inibir o desenvolvimento a blastocisto quando presente em todo o desenvolvimento embrionário, como no sistema de cultivo único (tabela 1) (AZADBAKTH; VALOJERDI, 2008).

Outra macromolécula presente no trato reprodutivo feminino é o ácido hialurônico, um polissacarídeo de alto peso molecular, que melhora os sistemas de cultivo de embriões e pode levar ao aumento da taxa de implantação.

#### *2.3.4 Interferentes dos meios de cultivo*

- **Fonte proteica**: um componente do meio de cultivo que pode influenciar a expressão gênica, principalmente aos relacionados ao estresse é o soro. É sabido que o soro possui fatores embriotróficos e embriotóxicos (BAVISTER, 1995). Este efeito bifásico do soro sobre o desenvolvimento embrionário é demonstrada quando se avalia a cinética do desenvolvimento dos embriões, onde se mostra uma ação restrita sobre os estádios iniciais e auxilia o desenvolvimento de mórula até blastocisto, além de aumentar o número de células, e estimulando a eclosão dos blastocistos (BAVISTER, 1995).

Apesar de o soro estimular a produção de blastocisto (CAMARGO et al., 2002, RIZOS et al., 2003) este pode causar algum tipo de distúrbio na expressão gênica, apresentando efeitos negativos na qualidade dos embriões (PURPERA et al., 2009). A maioria dos meios de cultivo para embriões humanos contém albumina sérica como fonte de proteína. A albumina recombinante de soro humano se tornou disponível recentemente, e seu uso deve eliminar os problemas inerentes à

utilização de produtos derivados de sangue, além de levar a padronização dos meios (NAGY; GRECO, 2010).

- **pH e dióxido de carbono:** garantir um pH ótimo é um dos pontos críticos de um sistema de cultivo de embriões (pH =7,4). Em condições ideais de concentrações iônicas, níveis de CO<sub>2</sub> e temperatura, esta reação tende a atingir o equilíbrio, e com isso manter o pH constante (COELHO et al., 2006).

A manutenção do pH adequado deve ser feito por ajuste do sistema de CO<sub>2</sub> da incubadora, que deve estar normalmente entre 5-7%. O oxigênio também é outro componente crítico, já que embora tenha sido demonstrado que os embriões da maioria das espécies crescem em presença de oxigênio “atmosférico” (21%), já foi comprovado que uma pressão de oxigênio mais baixa (cerca de 5%) é mais vantajosa para o crescimento e viabilidade dos embriões (NAGY; GRECO, 2010).

- **Volume de cultivo ou do tamanho da gota de cultivo:** tanto volumes muito grandes quanto volumes muito pequenos têm a possibilidade de ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário *in vitro* (NAGY; GRECO, 2010).

Tabela1: Comparação entre a composição dos meios de cultivo comerciais propostos para desenvolvimento de embriões humanos

Componentes dos meios	Sequencial		Sequencial		Único
	G1®	G2®	ECM®	Multiblast®	Global®
Ácido lipólico	X				
Alanina	X	X		X	X
Alanil-glutamina	X	X	X	X	X
Arginina		X		X	X
Asparagina	X	X		X	X
Aspartato	X	X		X	X
Bicarbonato de sódio	X	X	X	X	X
Cloreto de calico	X	X	X	X	X
Cloreto de potássio	X	X	X	X	X
Cloreto de sódio	X	X	X	X	X
Cistina		X		X	X
Citrato de sódio	X	X	X	X	
EDTA	X		X		X
Fenilalanina		X		X	X
Fosfato de potássio				X	X
Fosfato dehidrogenado de sódio	X	X			
Gentamicina	X	X	X	X	X
Glicose	X	X	X	X	X
Glicina	X	X		X	X
Glutamato	X	X		X	X
Histidina		X		X	X
Hyaluronan	X	X			
Isoleucina		X		X	X
Lactato de sódio	X		X	X	X
Leucina		X		X	X
Lisina		X		X	X

Tabela1 continuação: Comparação entre a composição dos meios de cultivo comerciais propostos para desenvolvimento de embriões humanos

Componente dos meios (cont.)	Sequencial		Sequencial		Único
	G1®	G2®	ECM®	Multiblast®	Global®
Metionina	X	X		X	X
Penteonato de calico		X			
Piridoxina		X			
Piruvato	X	X	X	X	X
Prolína	X			X	X
Riboflavina		X			
Serina	X				X
Sulfato de magnésio		X	X	X	X
Taurina	X		X	X	X
Tiamina		X			
Tirosina		X		X	X
Treonina		X		X	X
Triptofano		X		X	X
Valina		X		X	X
Vermelho de fenol			X	X	X

#### 2.4 Critérios para avaliação da qualidade embrionária

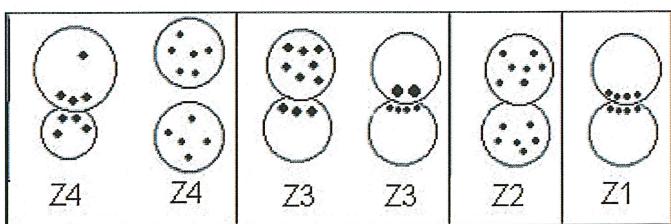
Tornou-se necessário o desenvolvimento de metodologias de seleção dos pré-embriões de maneira a garantir a máxima taxa de sucesso do tratamento perante um número mínimo de pré-embriões transferidos por tentativa.

Desde o início da utilização da FIV, um grande avanço no desenvolvimento de medicamentos e protocolos para estimulação ovariana, o desenvolvimento da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide e das técnicas de cultivo embrionário em laboratório ocorreram. No entanto um aspecto inalterado foi à avaliação da qualidade embrionária, a qual é ainda baseada em critérios morfológicos, tais como: aspectos do citoplasma ovocitário e de seu espaço

subzonal, escore de pronúcleos, velocidade de desenvolvimento embrionário (clivagem precoce, taxa de clivagem e número de blastômeros); simetria dos blastômeros e grau de fragmentação. Enquanto a avaliação morfológica tem a vantagem de ser não invasiva, tem por outro lado a desvantagem de ser imprecisa e subjetiva (SOARES; AUGUSTO; RODRIGUES, 2010).

#### *2.4.1 Avaliação morfológica do zigoto em estádio de dois pronúcleos (2PN)*

A qualidade embrionária pode ser prognosticada, indiretamente, pela avaliação morfológica do zigoto em estádio de dois pronúcleos. Uma vez ocorrida a fertilização do ovócito, a justaposição dos pronúcleos masculino e feminino é obtida por ação e orientação dos centríolos e microtúbulos oriundos do espermatozoide (Figura 1B) (AHUMADA et al., 2006). Esse alinhamento pode ser observado entre 16 a 18 horas da inseminação, e sua ausência significa falha de um ou mais eventos que caracterizam a fertilização normal (SOARES; AUGUSTO; RODRIGUES, 2010). A avaliação morfológica está baseada na localização e número dos corpos precursores de nucléolos (CPN) nos compartimentos pronucleares, masculino e feminino. Assim como, também, a formação de um halo no córtex do ovócito, produto da contração das organelas citoplasmáticas ao redor dos PN, que seriam preditivos da qualidade embrionária. Relaciona-se, então, com qualidade embrionária o alinhamento e posicionamento dos nucléolos no interior dos pronúcleos, além da simetria em número. O escore de pronúcleos é variável no padrão um a quatro (Z1, Z2, Z3 e Z4), onde o padrão um e dois apresenta altas probabilidades de desenvolvimento e gravidez, enquanto que os padrões de três e quatro apresentam poucas probabilidades de desenvolvimento e gravidez (Figura 1 A) (AHUMADA et al., 2006).



Fonte: acervo pessoal

Figura 1 A: Classificação pronúcleo segundo dispersão nucléolo



Fonte: acervo pessoal

Figura 1 B: Foto ilustrativa ovócito humano fertilizado - pronúcleo humano – padrão Z1

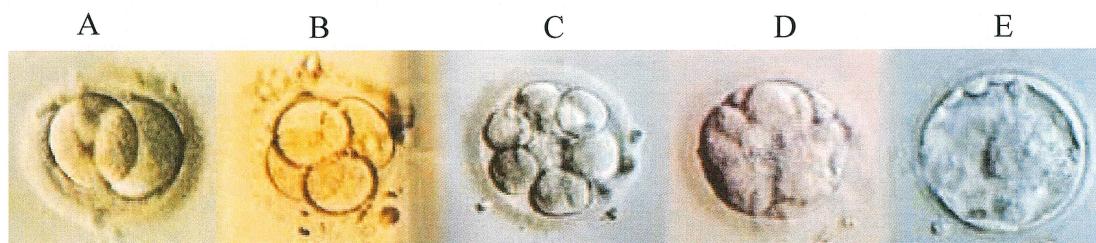
#### *2.4.2 Desenvolvimento embrionário e morfologia*

- **Clivagem:** o processo de divisões mitóticas se inicia quando dois pronúcleos haploides duplicam seu DNA e em seguida, se unem ocorrendo assim a singamia 20 a 34 horas depois da inseminação ovocitária. Com 35 a 36 horas, segue-se a primeira divisão com a consequente formação de dois blastômeros diploides (Figura 2A) e com cerca de metade do volume citoplasmático do ovócito fertilizado que deu origem. Assim, sucessivamente ocorrem numerosas divisões celulares, com aumento do número de blastômeros e volume progressivamente menor nas células. Uma entrada precoce na primeira divisão celular, em um período de até 25 horas da inseminação, correlaciona-se com aumento da viabilidade embrionária e maior taxa de gestação (RIZOS et al., 2003; BEN-YOSEF et al., 2004; SEPULVEDA et al., 2009; CIRAY et al., 2012).

Normalmente no dia 2 de cultivo celular (45 a 46 horas pós-inseminação) os pré-embriões atingem o estádio de quatro células (Figura 2B), e no dia 3 (54 a 57 horas pós-inseminação), o estádio de oito células (Figura 2C). Isoladamente e por características individuais, as células podem mostrar uma assincronia nas divisões celulares, produzindo pré-embriões com número irregular de blastômeros. Também na passagem de quatro para oito células ocorre a transição da expressão gênica maternal para embrionária nos pré-embriões (SOARES; AUGUSTO; RODRIGUES, 2010).

- **Mórula - blastocisto:** a mórula é observada a partir do quarto dia após a inseminação, (Figura 2D) a qual apresenta alta atividade citoplasmática, aumento na adesão célula-célula, com perda da definição individual dos blastômeros, caracterizando o fenômeno da compactação. A partir da bomba de sódio e potássio, localizada na membrana celular, o sódio é bombeado ativamente para o espaço extracelular, a blastocele é formada por acúmulo de água, que flui passivamente para uma cavitação. Forma-se assim o blastocisto em que se identificam trofoectoderma e as células da massa central, propriamente dita. Normalmente se observa a formação do blastocisto entre cinco e sete dias (Figura 2E). A evolução do blastocisto se dá com a expansão progressiva do seu volume e, consequentemente adelgaçamento da zona pelúcida, o que, ao final, resultará em uma rotura desta, a

qual permite a herniação do blastocisto, em processo denominado eclosão (SOARES; AUGUSTO; RODRIGUES, 2010).



Fonte:arquivo pessoal

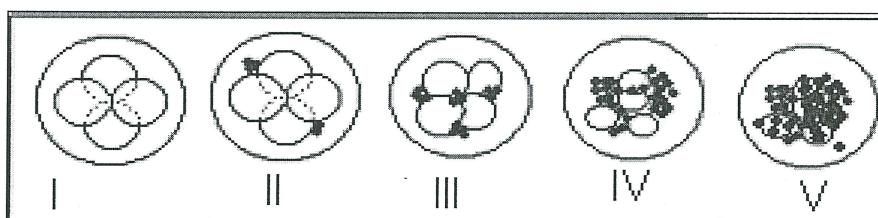
Figura 2: Figura ilustrativa dos estádios de desenvolvimento embrionário: A- embrião no estádio de duas células; B - embrião no estádio de quatro células; C - embrião no estádio de oito células; D - embrião no estádio de mórula; E - embrião no estádio de blastocisto expandido.

- **Fragmentação:** outro parâmetro comumente utilizado para a seleção de pré-embriões é a fragmentação embrionária, extrusão de parte da membrana citoplasmática e citoplasma subjacente para o espaço extracelular (AHUMADA et al., 2006). A interpretação da fragmentação celular para o potencial de desenvolvimento do pré-embrião deve ser correlacionada com a quantidade e com a distribuição desses fragmentos (Figura 3). Uma fragmentação numerosa e de distribuição difusa pode significar a perda de proteínas essenciais e regulatórias e levar ao comprometimento do potencial embrionário. Ao contrário, uma fragmentação numerosa, mas localizada, poderá significar apenas o resultado de divisões com pequenas imperfeições da citocinese, com pouco ou nenhum comprometimento desse potencial (SOARES; AUGUSTO; RODRIGUES, 2010).

Os parâmetros da análise morfológica foram estabelecidos primeiramente por Veeck, em 1988, segundo a qual os embriões foram divididos de acordo com o número de células em cada dia de desenvolvimento, a simetria dos blastômeros e a quantidade de fragmentação (Tabela 2) (AHUMADA et al., 2006).

Tabela 2: Classificação morfológica para avaliação da qualidade embrionária.

GRAU	PARÂMETROS
I	Embrião com blastômeros de igual tamanho; sem fragmentos citoplasmáticos e com citoplasma claro e homogêneo.
II	Embrião com blastômeros de igual tamanho e menos de 30% de fragmentos citoplasmáticos.
III	Embrião com blastômeros de tamanhos diferentes; zero % de fragmentos citoplasmáticos.
IV	Embrião com blastômeros de tamanho igual ou desigual; com 30% a 50% de fragmentos citoplasmáticos.
V	Embrião com mais de 50% de fragmentos citoplasmáticos.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 3: Figura ilustrativa da avaliação da qualidade embrionária: grau I; grau II; grau III; grau IV; grau V.

## 2.5 Outros métodos para avaliação da qualidade embrionária

Atualmente, o estudo da atividade metabólica, do estresse oxidativo, assim como a imunologia do pré-embrião em seus microambientes de cultivo *in vitro* vem se tornando interesse de estudo e utilização nas práticas do laboratório. A utilização de métodos não invasivos, os quais estudam o ambiente de cultivo, visando detectar

o consumo de substâncias que compõem esse ambiente biológico, parece ser promissora no sentido de se diminuir a pequena exatidão de avaliação dos métodos que envolvem a morfologia do desenvolvimento embrionário (SOARES; AUGUSTO; RODRIGUES, 2010). Já o desenvolvimento da biologia molecular tem propiciado um melhor entendimento dos mecanismos biológicos celulares, através de métodos denominados invasivos, nos quais é necessária a manipulação do embrião (VANDA ELE et al., 2007). Como exemplos de métodos invasivos de seleção embrionária podem-se citar diagnóstico pré-implantação, técnica de túnel e estudo da expressão gênica. Os dois últimos somente são utilizados em pesquisas com a finalidade comparativa de avaliação de qualidade embrionária, já que todo o embrião é necessário para a realização do método, não sendo empregado na rotina nos laboratórios de reprodução assistida.

#### *2.5.1 Dosagem de marcadores bioquímicos*

Identificação do metabolismo embrionário no cultivo dos embriões, através do proteoma, que permite descrever as mudanças em todas as proteínas expressas e produzidas a partir de um único genoma. O aumento da sensibilidade dessa técnica permitiu o desenvolvimento de protocolos que são capazes de conhecer proteínas produzidas pelo embrião na gota de cultivo, o denominado secretoma. A partir desse conhecimento as proteínas envolvidas na maturação dos ovócitos e no desenvolvimento dos embriões *in vitro* puderam ser correlacionadas com altas taxas de implantação e poderá contribuir para elaboração de teste não invasivo de viabilidade para auxiliar na seleção de embriões para transferência. Como exemplo podem-se citar os estudos com a dosagem da proteína chamada antígeno leucocitário humano solúvel-G (sHLA-G), em cultura de pré-embriões, os quais demonstram maiores taxas de gravidez quando este é detectado no meio de cultivo (SOARES; AUGUSTO; RODRIGUES, 2010).

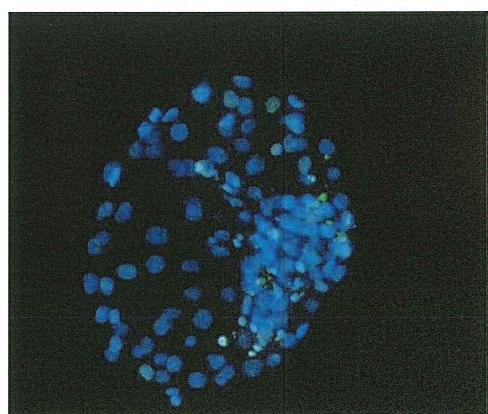
#### *2.5.2 Diagnóstico genético pré-implantação (DGPI)*

Análise cromossômica de pré-embriões antes da transferência, promovendo seleção embrionária de embriões normais. As técnicas mais utilizadas para análise

do complemento cromossômico dos blastômeros são Fluorescência e Hibridização *in situ* (FISH) e Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

### 2.5.3 Técnica de túnel para avaliação da qualidade embrionária

A apoptose, forma programada de morte celular, é um processo de regulação de populações e linhagens celulares nos sistemas de mamíferos. É caracterizada por fragmentação citoplasmática e nuclear, condensação de cromatina e fagocitose (VANDA ELE et al., 2007). Uma técnica que tem se mostrado eficiente na marcação de células apoptóticas embrionárias é o túnel, que consiste na utilização da enzima terminal deoxinucleotidil transferase (TdT), a qual promove a ligação da fluoresceína na 3'OH do DNA degradado (BYRNE et al., 1999). Através da relação de número de blastômeros intactos com o número de blastômeros danificados e o índice apoptótico, é possível avaliar a qualidade embrionária (KELKAR; DHARMA; NANDEDKAR, 2003). Ultimamente, tem-se relacionado a apoptose celular às condições desfavoráveis a que o embrião é submetido durante o processo de cultivo *in vitro*. Acredita-se que este processo de morte celular tem a função de eliminar embriões anormais durante o primeiro ciclo celular em camundongos e no segundo ciclo celular em bovinos e humanos. Então, a apoptose tem sido utilizada como indicadora de qualidade embrionária (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002; VANDA ELE et al., 2007). Para exemplificar, a figura abaixo mostra a imagem de blastocisto bovino corado por solução de DAPI. A fragmentação no blastocisto foi revelada pela fluorescência verde após realização do túnel (Figura 4).



Fonte: Acervo pessoal

Figura 4: Imagem blastocisto bovino, onde os blastômeros íntegros apresentam-se corados por solução de DAPI (azul), e os blastômeros fragmentados apresentam-se corados de verde.

#### 2.5.4 Expressão gênica

É sabido que após a fertilização e até o fim da primeira divisão mitótica, toda a biossíntese de proteínas do embrião ocorre de forma independente da transcrição gênica. Assim, todos os RNAs, ribossomas e demais fatores necessários ao processo de tradução (síntese de proteínas) neste período são provenientes do ovócito, e desta forma têm origem exclusivamente materna (TESARIK, 2005). A ativação do genoma embrionário ocorre, em humanos, apenas no estádio de oito células e recebe o nome de “transição maternozigótica” (MZT). Diversos genes expressos no embrião durante o período pré-implantação, de diferentes espécies de mamíferos já foram caracterizados (WATSON; NATALE; BARCROFT, 2004). Análises de outros genes isoladamente e também do transcriptoma de blastômeros têm sido realizadas com o objetivo de melhor entender a determinação genética do desenvolvimento embrionário.

Além disso, estudos têm sido realizados na tentativa de caracterizar os efeitos prejudiciais da cultura de embriões *in vitro* sobre seus mecanismos de controle da expressão gênica. Embora seja razoável utilizar porcentagem de embriões que atigem o estádio de blastocisto como marcadores de eficácia de sistemas de cultivo, é provável que em alguns casos, os efeitos de uma dada cultura possa não manifestar-se na morfologia do embrião, alterando o embrião em sua ultra-estrutura, induzindo modificações epigenéticas nos embriões, sendo necessários estudos a nível molecular (CAMARGO et al., 2005; OLIVEIRA; LOPES; RODRIGUES, 2005; BALASUBRAMANIAN et al., 2007; WRENZYCHI; HERRMANN; NIEMANN, 2007).

Camargo e colaboradores (2005) já haviam descrito que o meio de cultivo influencia a expressão gênica em embriões bovinos no estádio de pré-implantação. A justificativa para a modificação da expressão gênica parece estar diretamente relacionada com conteúdos dos meios de cultivo, ou por uma variação das macromoléculas presente nos mesmos, ou na composição de aminoácidos ou até mesmo a formulação básica dos meios de cultivo, o que reflete em uma resposta proporcional de transcritos (OLIVEIRA; LOPES; RODRIGUES, 2005).

Entretanto, as alterações na expressão de genes, durante o período pré-implantação, parecem afetar o desenvolvimento embrionário e fetal, e contribuir para alterações no percentual de ácidos graxos da membrana lipídica e inibição da síntese de substâncias antioxidantes, podendo estar associados a diferentes modificações epigenéticas e, consequentemente, anormalidades fenotípicas e induzir as perdas iniciais fetais e embrionárias (NIEMANN; WRENZYCKI, 2000; AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; PAULA-LOPES et al., 2003; OLIVEIRA; LOPES; RODRIGUES, 2005; FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006).

Desde então, genes facilitadores de glicose *GLUT1* e *GLUT5* e genes relacionados ao estresse oxidativo *HSP70.1*, *PRDX1* vem sendo associados à qualidade do embrião produzido *in vitro* (BERTOLINI et al., 2002, FEUGANG, CAMARGO-RODRIGUEZ, MEMILI; 2009).

O entendimento das condições de cultivo *in vitro*, as quais podem implicar em modificações epigenéticas que podem afetar o desenvolvimento fetal e seu mecanismo de regulação (JACOB; MOLEY, 2005; EL HAJJ; HAAF, 2013) e o entendimento da correlação entre as mudanças na expressão gênica poderão aumentar o sucesso das técnicas de reprodução assistida.

**- Genes relacionados ao estresse oxidativo: *HSP70.1* e *PRDX1*:** o cultivo *in vitro* tem sido associado à produção de radicais livres, causando estresse oxidativo nos embriões (BALASUBRAMANIAN et al., 2007). Em contrapartida, a expressão de genes, como, *HSP70.1* e *PRDX1* estão sendo corelacionados a diferentes tipos de estresse (LEE; SEO, 2002; OLIVEIRA; LOPES; RODRIGUES, 2005; FEUGANG; CAMARGO-RODRIGUEZ; MEMILI, 2009; SHARMA et al., 2012), como o calor e estresse oxidativo (LUFT; DIX, 1999). Além disso, o *PRDX1* ainda está associado a defesa da célula contra espécies reativas de oxigênio geradas em condições inadequadas de cultivo (NEUMANN et al., 2003; IMMENSCHUH; BAUMGART-VOGT, 2005; FEUGANG; CAMARGO-RODRIGUEZ; MEMILI, 2009).

Segundo Feugang, Camargo-Rodriguez e Memili (2009), a expressão de genes como o *HSP70.1*, os quais tem como função principal inibir a apoptose, são resultados de alto nível de radicais livres no sistema de cultivo, sendo associados à degeneração do blastocisto, devido a um acúmulo progressivo de efeitos tóxicos durante o cultivo (SHARMA et al., 2012). Em contrapartida, a menor expressão dos genes *HSP70.1* e *PRDX1* nos sistemas de cultivo pode estar correlacionada à

presença de componentes antioxidantes nos meios de cultivo, como o etilenediaminetetraacetico, EDTA, que tem a função potencial de agir como quelante de íons metálicos, apresentando um papel antioxidante sobre a cultivo dos embriões o que pode contribuir para os proteger contra os radicais livres, reduzindo o efeito de expressão de genes *HSP70.1* e *PRDX1* (ORSI; LEESE, 2001; AZADBAKTH; VALOJERDI, 2008; HENTEMANN; BERTHEUSSEN, 2009). Outro componente nos meios de cultivo que pode influenciar a expressão de genes associados ao estresse é o soro, o qual é conhecido por ter fatores embriotróficos e embriotóxicos (BAVISTER, 1995). Apesar do soro estimular a produção de blastocisto (CAMARGO et al., 2002; RIZOS et al., 2003), também pode perturbar a expressão gênica (PURPERA et al., 2009). Rizos e colaboradores (2003), por exemplo, encontraram aumento da expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com a proteção contra o estresse oxidativo, como MnSOD e SOX, em embriões cultivados com soro.

**- Genes relacionados ao metabolismo: facilitadores do transporte de glicose 1 e 5 (*GLUT1* e *5*):** os genes facilitadores de glicose 1 e 5 desempenham um papel importante no fornecimento de substratos metabólicos em mamíferos e sabe-se que alterações no transporte, na captação de glicose e metabolismo, nas primeiras fases do desenvolvimento, podem afetar o desenvolvimento fetal (TONACK et al., 2006; BARCELÓ-FIMBRES; SEIDEL, 2007; PURCELL; MOLEY, 2009; TONACK et al., 2009, RUBESSA et al, 2011).

O *GLUT1* é uma isoforma ubíqua responsável pelo transporte de glicose para o interior das células embrionárias durante todo o período de pre-implantação (BERTOLINI et al., 2002). Diferentemente do *GLUT1*, a transcrição de *GLUT5* começa no momento da ativação do genoma embrionário, indicando participar da diferenciação celular. A fim de demonstrar a importância dos transportadores de glicose como moléculas reguladoras de desenvolvimento embrionário, Pantaleon e Kaye (1998) mostraram que a subregulação gênica resultou em diminuição do número de células de embriões produzidos *in vitro*, quando comparado com embriões produzidos *in vivo*. Embriões com desenvolvimento mais rápido expressaram mais transcritos de genes associados ao metabolismo, como o *GLUT1* (LIM et al., 2007, PALASZ et al., 2008). Bertolini e colaboradores (2002) também detectaram baixa expressão de *GLUT1* e *GLUT3* em embriões produzidos *in vitro*,

quando comparado com embriões produzidos *in vivo* e afirmaram que a sub-regulação dos genes *GLUT1* e *GLUT3* afeta a glicólise dos embriões e, consequentemente, o metabolismo e o desenvolvimento embrionário.

É importante ressaltar que a expressão de genes associados ao transporte de açúcar também diferem de acordo com o ambiente em que os embriões são cultivados. Estudo com pacientes humanos demonstraram que a expressão de *GLUTs* em leucócitos é reduzida na diabetes (KIPMEN-KORGUN et al., 2009), sugerindo que a concentração elevada de glicose pode diminuir a expressão de genes transportadores de açúcar. O efeito de meios de cultivo e de seus componentes na expressão de transportadores de glicose merece uma investigação mais aprofundada.

#### 2.5.4.1 Técnica de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (RT-PCR)

O advento da biologia molecular foi um dos maiores passos da biologia durante o século XX. A descoberta do PCR trouxe desenvolvimentos científicos como sequenciamento de genomas, expressão de genes, determinação rápida da paternidade, e o diagnóstico de doenças infecciosas (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A técnica de PCR consiste na replicação do DNA *in vitro*, catalisada por uma DNA polimerase, com o objetivo de amplificar sequências específicas dentro do DNA. A reação requer a presença dos quatro tipos de desoxinucleotídeos e de oligonucleotídeos sintéticos “primers” complementares às extremidades da região do DNA que se deseja amplificar. Estes “primers” funcionam como ponto de partida para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde. Cada ciclo de PCR envolve: (i) a desnaturação da molécula de DNA alvo a uma temperatura de 94°C; (ii) o anelamento dos “primers” a uma temperatura que pode variar de 35 °C a 60 °C; e (iii) a síntese da nova fita de DNA a 72 °C. Ao final de vários ciclos obtém-se um acúmulo exponencial de cópias da região delimitada pelos “primers” (COUTINHO; REGITANO, 2001).

A possibilidade de monitorar o PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. Na biologia molecular o PCR quantitativo em tempo real é uma técnica laboratorial baseada no princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR) para multiplicar ácidos nucleicos e quantificar o DNA obtido. A reação em cadeia de polimerização em tempo real

combina a metodologia de PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência. A metodologia permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa, auxiliando a obtenção de resultados e diminuindo o risco de contaminação da amostra e com maior reproduzibilidade porque determina valores durante a fase exponencial (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A emissão de compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto do PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. Os compostos fluorescentes mais utilizados são o SYBER Green® e TaqMan® (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

O SYBER Green®, molécula de fluoróforo que emite e absorve luz em comprimento de onda específico, se liga entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo termociclador, emite uma fluorescência verde. As vantagens de sua utilização se devem ao baixo custo, facilidade no uso, e sensibilidade. A desvantagem é a ligação em todo DNA de fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, podendo superestimar a concentração do fragmento alvo (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

### 3. MODELO EXPERIMENTAL

Não existe um modelo experimental ideal para se estudar o desenvolvimento embrionário humano. Os embriões de roedores e bovinos vêm sendo amplamente utilizados como modelo experimental para humanos pelas peculiaridades e similaridades existentes nos mesmos.

O modelo experimental bovino, por exemplo, tem grande impacto nas pesquisas científicas. Permite em um curto espaço de tempo, baixo custo e permissão ética, por se tratar de ovários oriundos de matadouro, realizar-se com grande repetibilidade o estudo de técnicas, utilizando os mesmos equipamentos usados para humanos. Os embriões também têm diâmetros semelhantes aos embriões humanos, além de grande similaridade no metabolismo energético, como consumo de glicose, piruvato e produção de lactato. Além disso, a ativação do genoma embrionário é iniciada em estádio próximo a humanos (8-16 células) (BAUMANN et al., 2007).

Já os roedores são tradicionalmente modelos experimentais mais utilizados por sua maior disponibilidade, fácil manejo, menor tempo de gestação e, principalmente, por apresentar homologia metabólica, ou seja, maior similaridade no requerimento de substratos com o embrião humano. Além disso, através da análise comparativa preliminar e da semelhança do genoma humano e de roedores, confirmou-se que os roedores devam ser os melhores modelos para estudos de regulação e controle de desenvolvimento embrionário tornado-se o modelo experimental para estudos pré-clínicos em humanos (BAUMANN et al., 2007). Tem sido proposto que os roedores podem ser utilizados como uma ferramenta para monitorar a qualidade do material, das condições de cultura, as técnicas e os equipamentos utilizados em laboratórios de FIV, e como um bioensaio para avaliar os efeitos potenciais dos contaminantes ambientais sobre a fertilização e embriogênese (PERIN et al., 2008). Em contrapartida, a ativação do genoma embrionário em roedores, ocorre em torno de duas células (FIORENZA et al., 2004), diferentemente do humano de oito células.

#### 4. HIPÓTESES

A qualidade dos blastocistos bovinos e de ratos é aumentada quando se utiliza o sistema de cultivo único no período de pré-implantação.

A hiperestimulação por gonadotrofinas pode ser utilizada de forma satisfatória para aumentar o número de embriões produzidos por ratas Wistar.

A contagem de células apoptóticas pela técnica de túnel pode ser utilizada para avaliação da qualidade de embriões de ratas Wistar.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo Geral

Avaliar o desenvolvimento e a qualidade de blastocistos bovinos e de ratos em sistema de cultivo único e sequencial, através do estudo do desenvolvimento dos embriões submetidos ao sistema de cultivo único (Global® – LifeGlobal®) e aos sistemas de cultivo sequencial (ECM®/Multiblast® - Irvine®, G1®/G2® - Vitrolife), comparando com sistema de cultivo utilizado rotineiramente para os modelos experimentais em bovino (CR2aa/SOFaa) e ratas Wistar (KSOM).

### 5.2. Objetivos Específicos

Avaliar:

- Taxa de clivagem, taxa de blastocisto em embriões íntegros e biopsiados;
- Cinética do desenvolvimento embrionário;
- Quantificação da expressão de diferentes genes em blastocisto bovinos: *HSP70.1, PRDX1, GLUT1 e GLUT5*;
- Viabilidade da superovulação em ratas Wistar;
- Qualidade de embriões, oriundos de ratas Wistar superovuladas, por desenvolvimento morfológico e presença de células apoptóticas através da técnica de túnel.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Estudos com embriões bovinos

#### 6.1.1 Obtenção de embriões bovinos

Todos os produtos químicos utilizados neste estudo são da Sigma Chemical Co. (St. Lois, MO), menos os que estão indicados no texto.

##### 6.1.1.1 Coleta de ovários e seleção dos ovócitos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora – MG, entre os meses de fevereiro de 2009 a setembro de 2011. Ovários de vacas mestiças obtidos no Matadouro Municipal de Juiz de Fora foram transportados em garrafa térmica, a 37°C, em solução salina contendo 0,005% de sulfato de estreptomicina (Figura 5A). No laboratório, eles foram lavados na mesma solução e mantidos em banho-maria a 37°C até o momento da aspiração (Figura 5B). Os complexos *cumulus*-ovócitos (CCO's) foram aspirados de folículos com diâmetro entre 2-8 mm, com auxílio de agulha com calibre de 21 G acoplada à seringa de 10 ml (Figura 5C). O período entre o abate e o início da aspiração não foi superior a 4 horas. Os CCO's foram mantidos em meio *Talp-Hepes* (BAVISTER; LEIBFRIED; LIEBERMAN, 1983) (Figura 6A), sendo selecionados aqueles com três ou mais camadas de células e citoplasma homogêneo (Figura 6B) (HAWK; WALL, 1994).

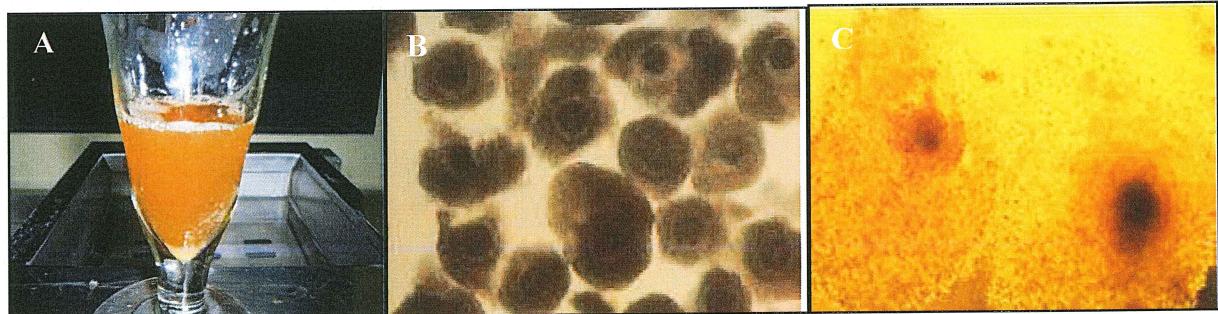


Fonte: acervo pessoal

Figura 5: Ilustração processo de coleta, lavagem e punção de ovários obtidos em matadouro. A - transporte dos ovários do matadouro ao laboratório da Embrapa; B - lavagem dos ovários anterior à aspiração; C - aspiração dos ovários.

#### 6.1.1.2 Maturação *in vitro* dos ovócitos

Os COC's foram maturados *in vitro* em grupos de 40 estruturas, em placas de quatro poços, com 400 µl de meio TCM-199 (Gibco® Labs., Grand Island, NY), acrescido de 10% de soro inativado de vaca em círculo e 20 µg/ml de FSH (Pluset, Serono, Italy), por 24 horas, em incubadora a 38,8 °C, com 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 6C) (RAMOS et al., 2006).



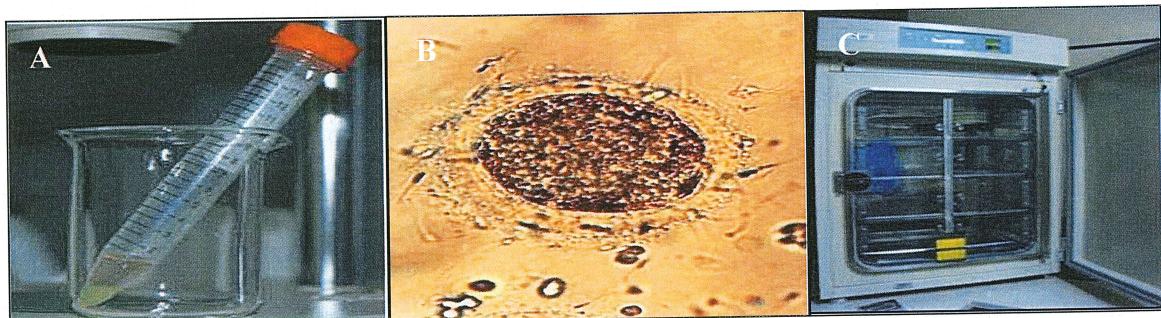
Fonte: acervo pessoal

Figura 6: Processo de seleção e maturação ovocitária: A - ovócitos aspirados mantidos em cálice para decantação; B - seleção de COC's com citoplasma homogêneo e três ou mais camadas de células do cumulus; C - ovócitos maturados – aspecto expandido das células do cumulus.

#### 6.1.1.3 Fertilização *in vitro* dos ovócitos

Após a maturação, os COC's foram fertilizados *in vitro* com sêmen de fertilidade reconhecida. Para a separação dos espermatozoides foi utilizado o método de *swim up* (PARRISH et al., 1986). A fertilização *in vitro* foi realizada com

15-25 COC's em gotas de 100 µl de meio *Fert-Talp*, suplementado com 20 µg/ml de heparina e 6 mg/ml de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA-V). Os COC's foram co-incubados com  $2,0 \times 10^6$  espermatozoides/ml, por 22 horas, nas mesmas condições atmosféricas da maturação (POLISSENI et al., 2010).



Fonte: acervo pessoal

Figura 7: Fertilização *in vitro*: A - preparo do sêmen pela técnica de *swim up*; B - fertilização do COC's; C - estufa incubadora onde se manteve todos os processos *in vitro*.

#### 6.1.1.4 Cultivo *in vitro* dos embriões

Após a fertilização, os prováveis zigotos foram semi-desnudados em meio *Talp-Hepes*, por pipetagem mecânica, e, distribuídos randomicamente para os grupos experimentais: sistema de cultivo sequencial, sistema de cultivo único, CR2aa, SOFaa (Organograma 1, 2). O cultivo embrionário foi realizado nas mesmas condições da fecundação (Figura 7C).

#### 6.1.1.5 Biópsia embrionária

Previamente à realização da técnica de biópsia, embriões de 8-16 células, do experimento 2, foram selecionados para realização da técincia. As estruturas foram retiradas das gotas de cultivo e lavadas em meio *Talp-Hepes* acrescido de 0,003% de álcool polivinílico (PVA). Os embriões para biópsias foram transferidos para placa de petri em microgotas de 5 µl de meio *Talp-Hepes*, sob óleo mineral e levados ao micromanipulador. Após imobilização dos embriões pela pipeta de fixação, procedeu-se à biópsia, pela inserção de micropipeta (30 µm - Transfix®) na posição de três horas (Figura 1). Foram aspirados blastômeros correspondentes à quarta parte da massa embrionária (POLISSENI et al., 2010).



Figura 8: Biópsia de embriões bovinos no terceiro dia após a fecundação: A - fixação do embrião; B - introdução da micropipeta de biópsia; C - embrião pós-biópsia e blastômeros retirados com a realização da técnica (seta).

Após a biópsia os embriões foram colocados em placas de cultivo “Well on the Well”, nos meios de cultivo específico para cada grupo, em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>, 95% de umidade a 38,5°C em ar, onde foram cultivados até 192 horas após fecundação (Organograma 2).

#### 6.1.1.6 Avaliação do desenvolvimento embrionário

A taxa de clivagem total e a proporção de embriões clivados em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário (2 células, 4-7 células e 8-16 células) foram calculados 72 horas após a fertilização (hpf). A taxa total de blastocisto e a proporção dos embriões em diferentes estádios de blastocisto (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) foi calculada 192 hpf.

A avaliação do estádio embrionário foi realizada de acordo com os parâmetros descritos no manual da Sociedade Internacional de Embriões Transferidos (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998). Todas as taxas foram calculadas baseadas no número de zigotos.



Fonte: acervo pessoal

Figura 9: A - avaliação taxa de clivagem e proporção dos embriões em diferentes estádios de desenvolvimento; B - avaliação da taxa de blastocisto e proporção dos embriões em diferentes estádios de blastocisto.

#### 6.1.1.7 Expressão Gênica – Quantificação dos transcritos

##### 6.1.1.7.1 Extração de RNA e Transcrição Reversa

Os *primers* para *HSP70.1* e *B ACTINA* foram desenhados a partir de sequências disponíveis no banco de dados do *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), utilizando o programa *Primer3* (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Enquanto os *primers* para *PRDX1*, *GLUT1* e *GLUT5* foram produzidos de acordo com Mourot et al (2006), Sargikaya et al., (2007) e Carmargo et al (2005), respectivamente. Todos os *primers* foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (Coralville, IA, EUA) e estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Sequência de primers e temperatura de anelamento específicas para cada gene avaliado

Gene	Sequência do primer (5'-3')	Temperatura anelamento	Tamanho fragmento (pb)	Nº de acesso genBank/referência
<i>PRDX1</i>	Forward:ATGCCAGATGGTCAGTTCAAG Reverse:CCTTGTTCTTGGGTGTGTTG	53°C	224	MOUROT et al. 2006
<i>HSP70.1</i>	Forward:AACAAGATCACCATCACCAACG Reverse:TCCTTCTCCGCCAAGGGTGTGTTG	59°C	275	NM174550
<i>GLUT1</i>	Forward:CCAAGGATCTCTCAGAGCACAG Reverse:TTCTTCTGGACATCACTGCTGG	53°C	110	SAGIRKA YA et al., 2007
<i>GLUT5</i>	Forward:CATGGTGGCGGGTACTGTTC Reverse:CGCAAAAATGACGAAGCTGTAAG	53°C	103	CAMARGO et al., 2005
<i>B ACTINA</i> (endógeno)	Forward:GACATCCGCAAGGACCTCTA Reverse:ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	53°C	205	NM_173979

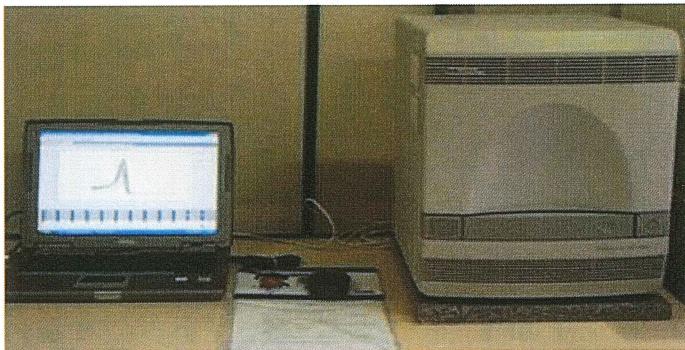
O RNA total foi extraído a partir de *pools* de 10 blastocistos por grupo (OLIVEIRA; LOPES; RODRIGUES, 2005; BALASUBRAMANIAN et al., 2007; PALASZ et al., 2008; LIM et al., 2007; SAGIRKAYA et al., 2006; SAGIRKAYA et al., 2007), utilizando o RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante e as tratadas com DNase. A lise das células foi feita com tampão RLT acrescido de 10% de β-Mercaptoetanol (β-ME; Gibco BRL Life Technologies, Nova York, EUA). O lisado foi homogeneizado, acrescido de etanol a 70% e transferido para uma coluna de obtenção do RNA. Para lavagem foi adicionado tampão RW1, e posteriormente foi realizada a incubação com solução de DNase por 15 minutos. Após este período ocorreu novamente à lavagem com o tampão RW1 e com o tampão RPE. Em seguida, foi feita a adição de etanol a 80%

na coluna e centrifugação para secar a membrana onde estava contido o RNA. Para eluição, foram utilizados 12 µl de água RNase-free, gerando um volume final de aproximadamente 11 µl (~55 ng). A transcrição reversa foi obtida com o kit comercial *SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix* (Invitrogen, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 6 µl (~30ng) de RNA foram utilizados em cada reação de síntese de cDNA. Uma reação contendo RNA, primer oligo dT, tampão de pareamento e água livre de RNase/DNAse foi incubada por 5 minutos a 65°C. Em seguida, 12 µL de um mix (2X *First-Strand reaction mix* e *SuperScript III RNaseOUT Enzyme mix*) foi adicionado à reação e esta foi incubada a 50°C por 50 minutos, seguido de 85°C por 5 minutos. O volume final foi de 20 µl (~14.000 ng) de cDNA por reação. Após a extração e transcrição reversa, 1 µl do RNA e cDNA de cada amostra foram avaliados em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA), para análise da concentração e pureza do material e os valores foram 592,87 ng/µl, 586,03 ng/ µl, 561,73 ng/ µl, 609,70 ng/ µl, com relação 260/280 de 1,57, 1,59, 1,52, 1,56, respectivamente para CR2aa, SOFaa, sistema único e sistema sequencial. O cDNA de cada grupo experimental permaneceu estocado em freezer a -80°C até posterior utilização.

#### 6.1.1.7.2 Quantificação de transcritos pelo RT-PCR

Quantificação relativa foi realizada em triplicata utilizando PCR em tempo real (ABI Prism 7300 *Sequence Detection System*; *Applied Biosystems*, Foster City, CA) (Figura 10). As reações foram preparadas com o kit comercial *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), com primers, água livre de nucleotídeos e cDNA. A quantidade de cDNA utilizado nas reacções variaram de acordo com a concentração ótima identificada em experimentos preliminares para cada transcrito analisado. As condições do PCR foram 95°C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 s e temperatura de anelamento do primer (Tabela 3) por 30s e 60°C por 30 s. Após cada corrida de PCR, uma análise de curva de fusão foi realizada para confirmar que um produto único específico foi gerado. Os controlos negativos, compreendendo o mix de reacção de PCR sem ácidos nucleicos, também foram analisados para cada grupo de amostras. *B-ACTINA* foi utilizada como um controle endógeno (BETTEGOWDA et al., 2006) e apresentou um coeficiente de variação do ciclo de 3,43% entre amostras. A

eficiência do primer foi calculada usando software LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Análises da abundância relativa foram realizadas utilizando software REST (PFAFFL; HORGAN; DEMPFL, 2002) e foram baseadas na eficiência primer.



Fonte: acervo pessoal

Figura 10: Aparelho de PCR em tempo real - *ABI Prism 7300 Sequence Detection System*

#### 6.1.1.8 Análise estatística:

Os dados de taxa de clivagem, taxa de blastocisto e proporção dos embriões em diferentes estádios de desenvolvimento foram analisados pelo teste do qui-quadrado. A análise da expressão gênica relativa foi avaliada pelo software *Relative Expression Software Tool* (REST<sup>®</sup>) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFL, 2002) que possui o modelo estatístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST*<sup>®</sup> (versão 384 - BETA, 2005). Valores da expressão gênica estão demonstrados em média ± desvio padrão. Diferenças foram consideradas significantes em nível de P<0,05.

#### 6.1.2 Delineamento experimental bovinos:

6.1.2.1 Experimento 1. Avaliação do desenvolvimento e qualidade embrionária de embriões bovinos em sistema de cultivo sequencial e único utilizados para humanos.

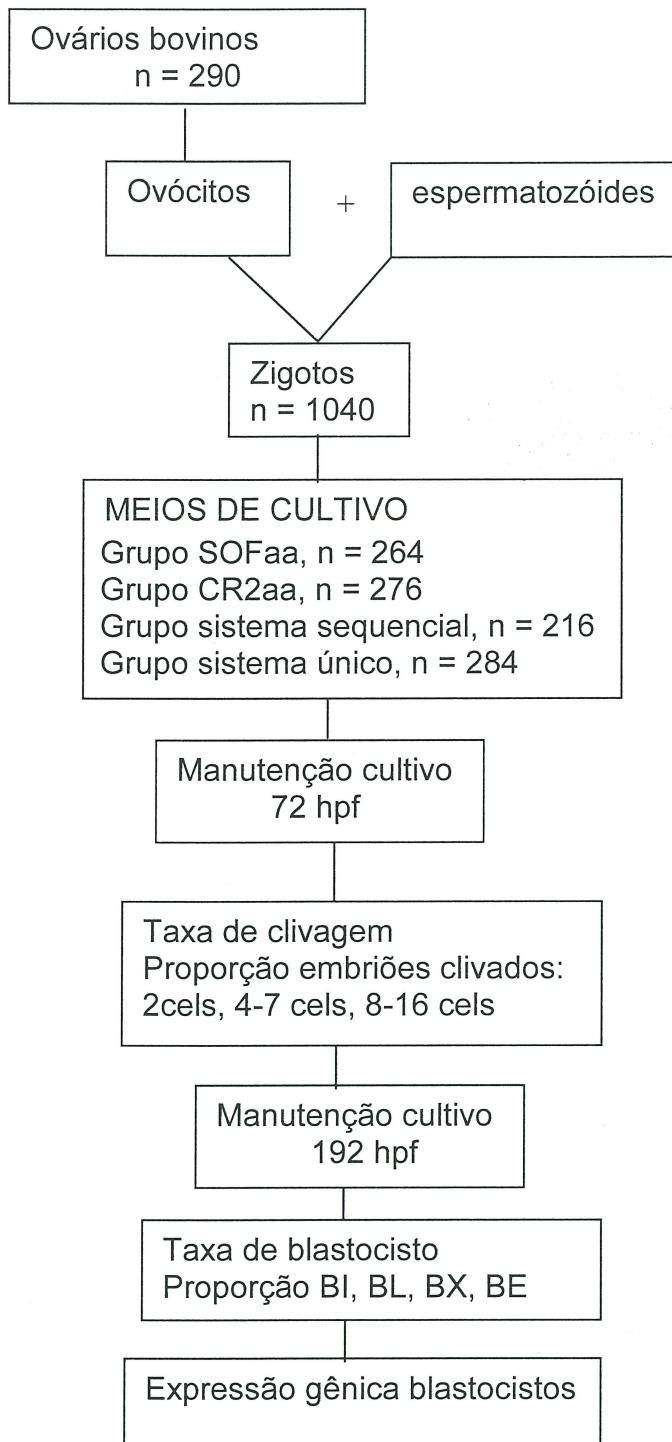
Após a fertilização, os presumíveis zigotos (n= 1040) foram randomicamente distribuídos nos seguintes sistemas de cultivo de cultivo:

- Grupo CR2aa: meio de cultivo CR2aa modificado (CAMARGO et al., 2011) suplementado com 5% de BSA e 10% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell, Campinas, SP, Brasil) ao longo de todo o período do cultivo, n = 276.
- Grupo SOFaa: meio de cultivo SOFaa (HOLM et al., 1999) suplementado com 5% de BSA e 10% de SFB ao longo de todo o período de cultivo, n = 264.
- Grupo sistema de cultivo seqüencial (sistema seqüencial): ECM®/Multiblast® (Irvine Scientific) meios suplementados com BSA 5%, ECM® até 72h após inseminação e depois cultivo em Multiblast®, n = 216.
- Grupo sistema de cultivo único (sistema único): meio de cultivo Global® (LifeGlobal®) suplementado com 5% de BSA ao longo de todo período de cultivo, n=284.

Em CR2aa, SOFaa e no grupo sistema de cultivo único, 50% do meio foi renovado no terceiro dia após a fertilização.

Avaliou-se a taxa de clivagem e de blastocisto 72 horas e 192 horas pós fertilização (hpf), respectivamente. Blastocistos foram avaliados quanto à expressão dos genes *PRDX*, *HSP70.1*, *GLUT1* e *GLUT5*, associados ao estresse e metabolismo embrionário (organograma 1 bovino).

#### 6.1.2.1.1 Organograma experimento 1 bovino



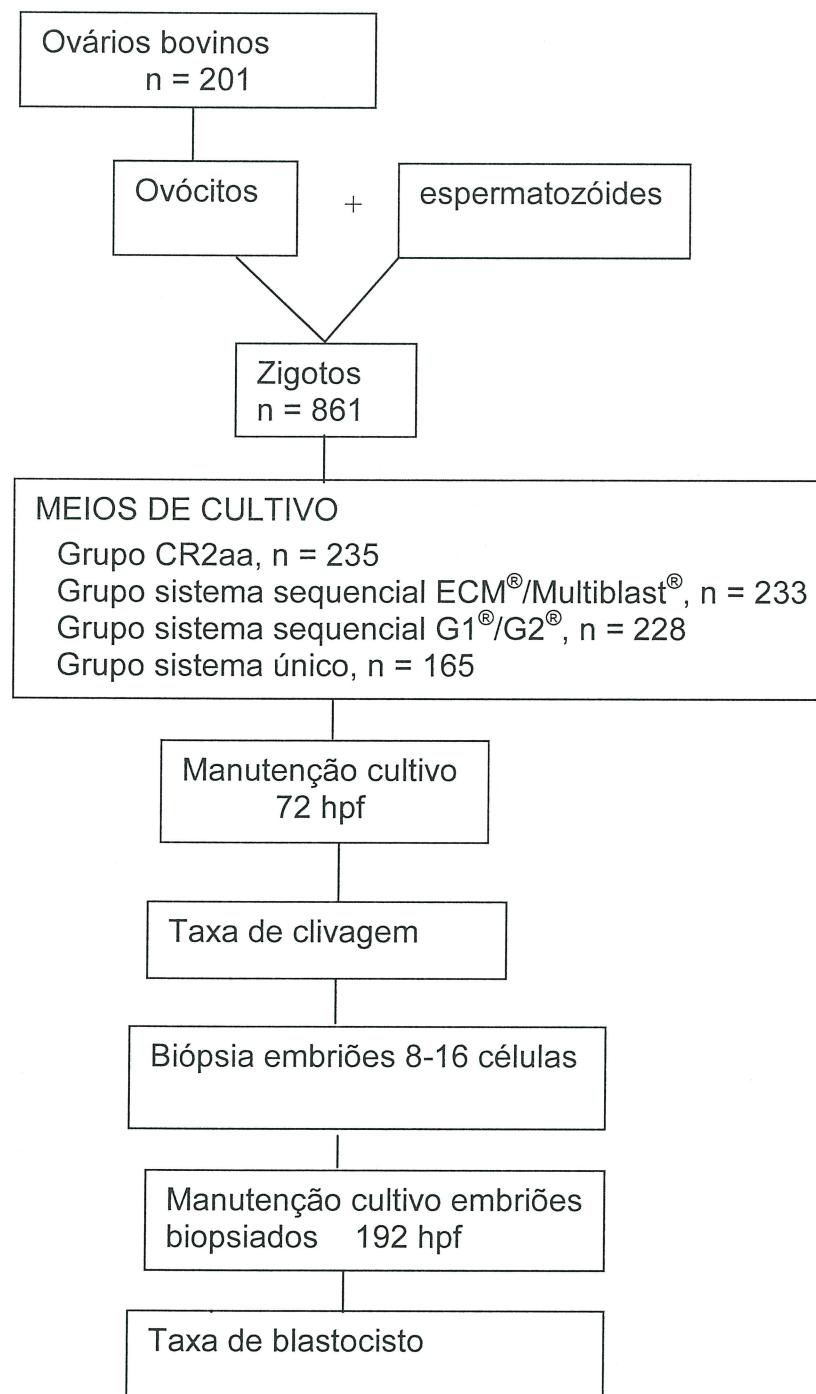
6.1.2.2 Experimento 2. Avaliação do desenvolvimento embrionário de embriões bovinos biopsiados em sistema de cultivo sequencial e único utilizados para humanos.

Após a fertilização, os presumíveis zigotos (n= 861) foram distribuídos, aleatoriamente, em diferentes sistemas de cultivo, onde foram cultivados, inicialmente, em gotas de cultivo de 50 $\mu$ l do meio, sob óleo mineral.

- Grupo CR2aa: meio de cultivo CR2aa modificado (CAMARGO et al., 2011) suplementado com 5% de BSA e 10% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell, Campinas, SP, Brasil) ao longo de todo o período do cultivo, n = 235.
- Grupo sistema de cultivo seqüencial (sistema seqüencial G1<sup>®</sup>/G2<sup>®</sup>): G1<sup>®</sup>/G2<sup>®</sup> - (Vitrolife) meios suplementados com BSA 5%, G1<sup>®</sup> até 72h após inseminação e depois cultivo em G2<sup>®</sup>, n = 228.
- Grupo sistema de cultivo seqüencial (sistema seqüencial ECM<sup>®</sup>/Multiblast<sup>®</sup>): ECM<sup>®</sup>/Multiblast<sup>®</sup> (Irvine Scientific) meios suplementados com BSA 5%, ECM<sup>®</sup> até 72h após inseminação e depois cultivo em Multiblast<sup>®</sup>, n = 233.
- Grupo sistema de cultivo único (sistema único): meio de cultivo Global<sup>®</sup> (LifeGlobal<sup>®</sup>) suplementado com 5% de BSA ao longo de todo período de cultivo, n=165.

Para todos os grupos, os embriões 8-16 células foram biopsiados e retornados para cultivo individual pelo sistema Well on the Well. Avaliou-se a taxa de clivagem e de blastocisto, 72 horas e 192 horas após fertilização (hpf), respectivamente.

#### 6.1.2.2.1 Organograma experimento 2 bovino



## 6.2 Estudos com embriões de ratas

### 6.2.1 Obtenção de embriões de ratas:

#### 6.2.1.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar, com aproximadamente doze semanas de vida, provenientes do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), Juiz de Fora, MG. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno com dimensões de 49x34x16 cm, cobertas com cama maravalha (não esterilizada) e dotadas de cocho para ração (Nuvilab<sup>®</sup>, Paraná, Brasil) e local para mamadeira abastecida com água filtrada *ad libitum* (Figura 11 A). A gaiola foi disposta em estantes climatizadas, com temperatura de 21°C, submetidas ao ciclo claro/escuro de 12 horas (Figura 11 B). Os machos foram colocados, individualmente, em gaiolas, já as fêmeas foram alojadas aos pares.



Fonte: acervo pessoal

Figura 11: A - gaiolas de polipropileno onde os animais ficaram acondicionados; B - estante climatizada onde as gaiolas ficaram dispostas.

#### 6.2.1.2 Superovulação

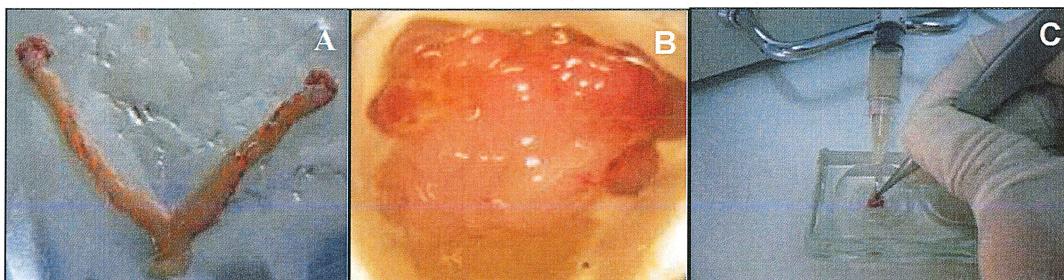
A superovulação foi realizada com 150 UI/kg de PMSG (Pregnant Mares Gonadotropin, Sigma – catálogo G-4877) para estimular a foliculogenese e 48 horas depois a ovulação foi induzida com 75 UI/kg de hCG (*Human Chorionic Gonadotropin*, Sigma – catalogo G-8554), (KON et al., 2005; KAGABU; UMEZU, 2006). Os hormônios foram aplicados intraperitonealmente e os animais denominados grupo controle do experimento 2 receberam volumes correspondentes de injeções de solução salina.

### 6.2.1.3 Experimento 1: A superovulação é eficaz para estimular foliculogênese e a ovulação *in vivo*?

Sessenta e seis ratas Wistar, com idade de 12 semanas, foram superovuladas, como descrito acima. Imediatamente após a administração do hCG as fêmeas foram alojadas em gaiolas individuais. O acasalamento foi realizado com macho de fertilidade comprovada, na proporção de 1:1. Na manhã seguinte os esfregaços vaginais foram realizados. Fêmeas com sinais de cópula ("plug vaginal" e / ou a presença de espermatozoides no esfregaço) foram sacrificados 24 horas após a administração de hCG, utilizando uma combinação de xilazina a 2% (10 mg/kg, Syntec, Cotia, SP) e quetamina a 10% (90 mg/kg, Syntec, Cotia, SP).

Ovários, ovidutos e cornos uterinos foram dissecados e removidos em bloco com a vagina (Figura 12A). Os órgãos foram então separados e colocados numa placa de Petri 35 mm, contendo 1,0 ml de meio TALP HEPES (GORDON, 1994) pré-aquecida a 37°C (Figura 12B).

A coleta dos embriões foi realizada separadamente a partir de cornos do útero e oviduto utilizando uma seringa de 3,0 ml e agulha de calibre 30 com o auxílio de lupa estereoscópica (Figura 12C). Os embriões recuperados foram contados e avaliados com relação a viabilidade utilizando um microscópio invertido.



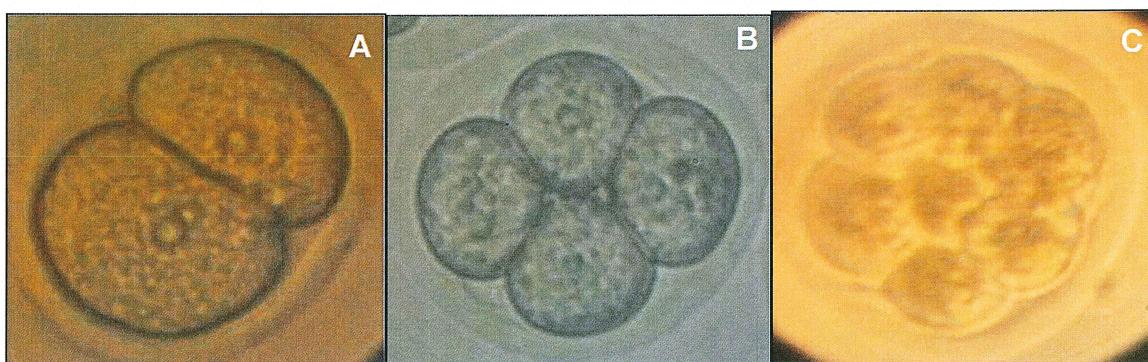
Fonte: acervo pessoal

Figura 12: A - ovidutos, ovários e cornos uterinos dissecados e removidos em bloco com a vagina; B - ovário e oviduto em placa de petri; C - coleta dos embriões

### 6.2.1.4 Experimento 2: A superovulação afeta o desenvolvimento embrionário?

Dezesseis ratas Wistar foram divididas em grupos controle e superovuladas. A superovulação, acasalamento e eutanásia foram realizados como descrito no experimento 1. Os ovários foram separados a partir dos ovidutos e pesados utilizando uma balança analítica.

As coletas dos embriões foram realizadas 48h e 72h após a administração do hCG. Embriões recuperados a partir de animais do grupo controle e superovulado foram examinadas através de microscópio invertido. O número total de células foi contado e a qualidade embrionária foi avaliada de acordo com os parâmetros descritos no Manual da Rede Latino-americana de Reprodução Assistida (AHUMADA et al., 2006), levando-se em consideração a avaliação da simetria do blastômero, homogenecidade e coloração do citoplasma, e a presença de fragmentação citoplasmática (Tabela 2 – Figura 13).



Fonte: acervo pessoal

Figura 13: Avaliação de embriões de ratas Wistar em diferentes estádios de desenvolvimento: A - embrião com duas células grau I; B- embrião com quatro células grau I; C - embrião com sete células grau I.

#### 6.2.1.5 Experimento 3: Avaliação da qualidade e da capacidade de desenvolvimento *in vitro* de embriões de ratas Wistar

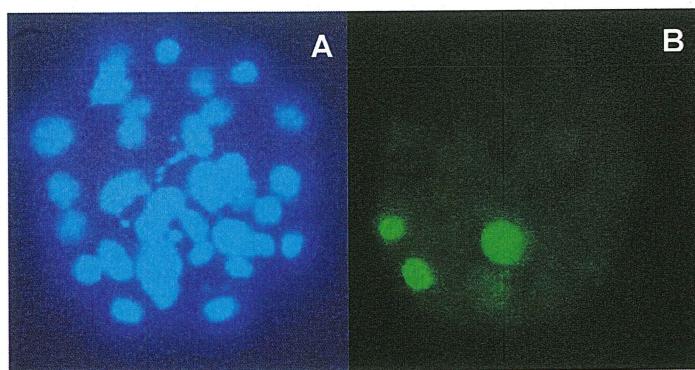
Oito ratas Wistar foram superovuladas, acasaladas e eutanasiadas como descrito no experimento 1.

A coleta dos embriões foi realizada 72h após a administração do hCG. Os embriões recuperados, através da lavagem dos ovidutos e cornos uterinos, foram cultivados em meio KSOM suplementado com 5% de albumina sérica bovina (BSA) (ERBACH et al., 1994) em estufa incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade a 37,0°C, por 48 horas (KON et al., 2005; KAGABU; UMEZU, 2006). A taxa de produção de blastocisto foi avaliada quarenta e oito horas após o início do cultivo embrionário, segundo os parâmetros descritos no Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998).

A verificação do índice apoptótico foi realizada segundo Kader et al.,(2009). Os blastocistos foram lavados em PBS acrescido de 0,1% de BSA e fixados em formaldeído a 4% a 4°C, por 25 minutos. Após o processo de fixação, os embriões foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,2%) por 5 minutos, lavados e equilibrados em tampão de equilíbrio por 5 a 10 minutos. Em seguida, foram incubados em tampão de incubação (tampão de equilíbrio, mix de nucleotídeo e enzima rTdT) por 1h a 37°C em atmosfera umidificada. Para controle da reação foi confeccionado um controle negativo, no qual o tampão de incubação - a enzima rTdT - foi substituído por água para não ocorrer à reação.

Após o período de incubação, os embriões foram transferidos para lâmina siliconizada, corados com VECTASHIELD e DAPI, recobertos com lamínula e observados em microscópio de fluorescência.

O número total de células foi obtido a partir da observação das células coradas pelo DAPI e visualizados em azul no filtro 460nm (Figura 14 A). Células em apoptose foram identificadas pela fluoresceína, corando-se de cor verde, observadas através do filtro 520±20nm (Figura 14 B). O índice apoptótico foi calculado a partir da relação do número total de células e o número de células apoptóticas, através do programa IMAGEJ. Já a taxa de produção de blastocisto foi expressa em porcentagem.



Fonte: acervo pessoal

Figura 14: Blastocisto corado: A - coloração dos blastômeros corados pelo DAPI e visualizados no filtro 460nm; B - células em apoptose identificadas pela fluoresceína através do filtro 520±20nm.

#### 6.2.1.6 Experimento 4: O sistema de cultivo influencia no desenvolvimento embrionário?

Dezoito ratas Wistar foram superovuladas, acasaladas e eutanasiadas como descrito no experimento 1.

A coleta dos embriões foi realizada 48h após a administração do hCG. Embriões recuperados foram distribuídos aleatoriamente segundo os grupos:

- Grupo KSOM, n = 96 : meio de cultivo KSOM suplementado com 5% de BSA ao longo de todo o período do cultivo.,
- Grupo sistema de cultivo seqüencial (sistema seqüencial), n = 103: ECM®/Multiblast® (Irvine meios suplementados com BSA 5%, ECM® até 48h após coleta embrionária e depois cultivo em MULTIBLAST®.
- Grupo sistema de cultivo único (sistema único), n= 149: meio de cultivo Global® (LifeGlobal®) suplementado com 5% de BSA ao longo de todo período de cultivo.

Em KSOM e no grupo sistema de cultivo único, 50% do meio foi renovado no terceiro dia de cultivo.

Os embriões foram cultivados em grupos de 15 estruturas, com gotas de 50 $\mu$ l, em placas de 60 mm, em incubadora a 37,0 °C, com 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. A taxa total de blastocisto e a proporção dos embriões em diferentes estádios de blastocisto (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) foi calculada 120 horas pós-coleta embrionária. A avaliação do estádio embrionário foi realizada de acordo com os parâmetros descritos no manual da Sociedade Internacional de Embriões Transferidos (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998).

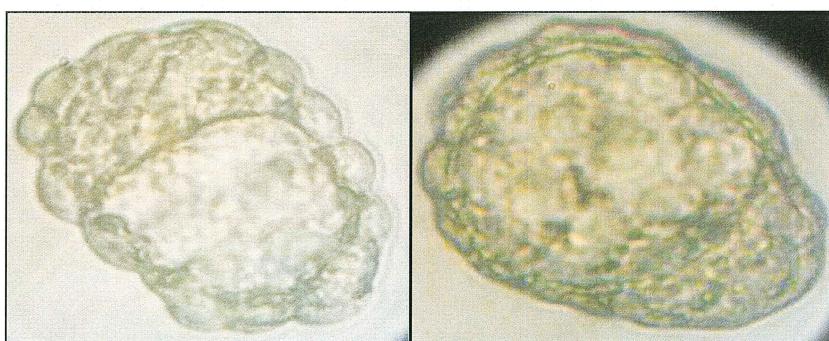


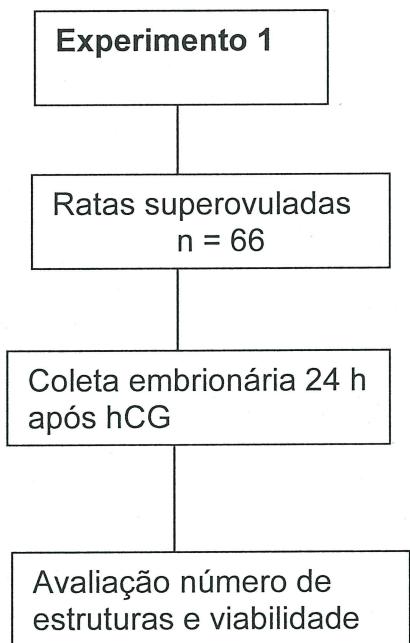
Figura 15: Avaliação de embriões de ratas wistar em diferentes estádios de blastocisto: A - blastocisto; B - blastocisto expandido.

#### 6.2.1.7 Analise estatística:

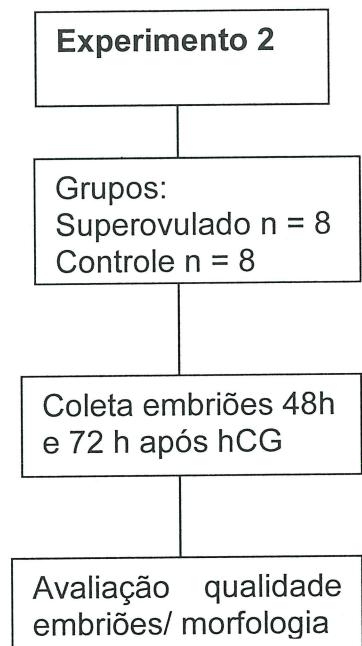
Diferenças entre grupos de número total de estruturas obtidas (experimento 1), entre classificação de qualidade embrionária (experimento 2) e taxa de blastocisto (experimento 3 e 4) foi realizado pelo teste do qui-quadrado. Diferença no peso dos ovários foi identificada pelo teste de Student. As variáveis descontínuas foram normalizadas através da transformação logarítmica (número de blastômeros apoptóticos) e de arcoseno (taxa de apoptose) e foram submetidas à ANOVA a 5% de significância, com auxílio do software SAEG (experimento 3). Diferenças foram consideradas significantes se  $P < 0,01$ .

#### 6.2.2 Delineamento experimental ratos

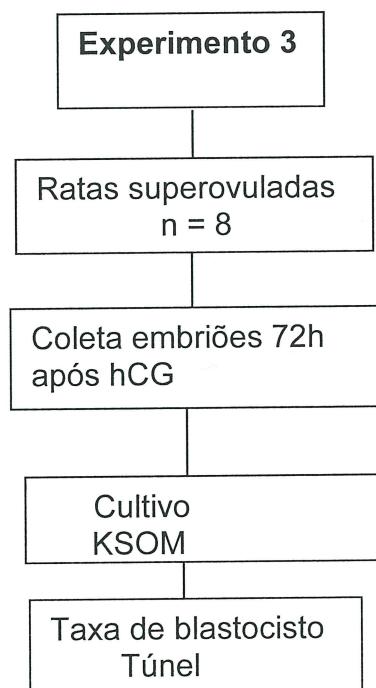
6.2.2.1 Experimento 1. A superovulação é eficaz para estimular foliculogênese e a ovulação *in vivo*? – Organograma experimento 1



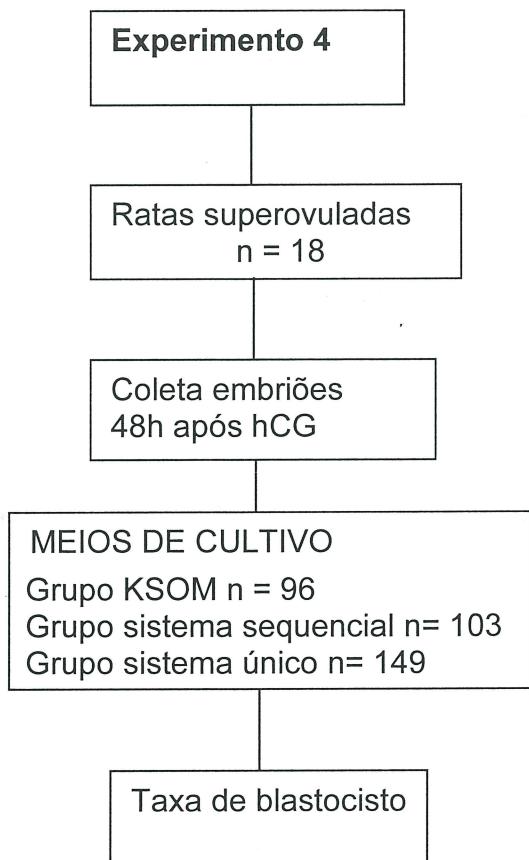
6.2.2.2.Experimento 2. A superovulação afeta o desenvolvimento inicial dos embriões? – Organograma experimento 2



6.2.2.3 Experimento 3. Avaliação da qualidade e da capacidade de desenvolvimento *in vitro* de embriões de ratas Wistar – Organograma experimento 3



6.2.2.4 Experimento 4. O sistema de cultivo influencia no desenvolvimento embrionário? – Organograma experimento 4



### **6.3 Termo de aprovação e compromisso da agência financiadora**

O projeto foi submetido à análise do Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da UFJF e foi aprovado, recebendo o número do protocolo 002/2009 para bovinos e 003/2009 para ratos. O projeto também foi aprovado pelo órgão financiador FAPEMIG (FAPEMIG – APQ-01749-08; Redes 26/2011 e 31/11).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Artigo bovinos

7.1.1 :Trabalho submetido para publicação Theriogenology - 2013

#### EFFECT OF SINGLE AND SEQUENTIAL CULTURE SYSTEM ON DEVELOPMENTAL COMPETENCE AND GENE EXPRESSION IN BOVINE EMBRYOS

*Juliana Polisseni<sup>a,b,c</sup>, M. Sc., Michele Munck Pereira<sup>a</sup>, M. Sc., Martha de Oliveira Guerra<sup>b</sup>, Ph.D., Carolina Campobiango Quintão<sup>a</sup>, M. Sc., Lilian Tamy Iguma<sup>a</sup> Ph.D, Wanderlei Ferreira de Sá<sup>a</sup>, Ph.D., Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>a</sup>, Ph.D., Vera Maria Peters<sup>b</sup>, Ph.D,*

#### Summary

The objective was to evaluate bovine embryo development and gene expression in embryos cultured in single or in sequential culture systems with media designed for human embryos, and compared them with CR2aa and SOF media, commonly used for bovine embryos. Cumulus-oocyte complexes were matured, fertilized in vitro at 38.8°C, 95% humidified air, and 5% CO<sub>2</sub>. Presumptive zygotes were semi-denuded and distributed randomly among groups: CR2aa, SOFaa, sequential system (ECM®/Multiblast® - Irvine®) and single system (Global® – LifeGlobal®). Cleavage and blastocyst rates were evaluated and differences between groups were analyzed using the Chi-square test. Real-time PCR was used for gene expression analysis in blastocysts. The quantification of gene expression was analyzed with REST® as *Pair Wise Fixed Reallocation Randomization TEST*®. No significant difference ( $P>0.05$ ) was observed in the overall cleavage rate among groups but there were differences in the distribution of embryos at different developmental stages. Higher ( $P<0.05$ ) overall blastocysts rate was found in single than in sequential culture system whereas it was similar ( $P>0.05$ ) to CR2aa and SOFaa. Differences ( $P<0.05$ ) on expression of *GLUT1* and *GLUT5* were found among embryos cultured in single and sequential systems. Comparisons also showed difference ( $P<0.05$ ) on gene expression among embryos cultured in single system and CR2aa (*HSP70.1, PRDX1*

and *GLUT5*) or SOFaa (*HSP70.1* and *GLUT1*). In conclusion, single culture system is more appropriated to bovine embryos than sequential one, achieving similar results to CR2aa and SOFaa media in terms of blastocyst production, but with differences on expression of genes associated to stress and sugar uptake.

**Key words:** sequential media, single medium, gene expression, embryo.

### 7.1.2 Abstract publicado na revista Fertility & Sterility - 2012

**RESULTS:** There was no difference in percent fertilization (82% CM, 84% OHM), cleavage (82% CM, 85% OHM) or total blastocysts developed of total oocytes undergoing ICSI (53% CM, 54% OHM). However, culture for the first 24 hours in OHM increased the percentage of good quality blastocysts from total oocytes undergoing ICSI (40% CM, 46% OHM,  $P=0.08$ ) and the percentage of good quality blastocysts of total blastocysts produced (77% CM, 85% OHM,  $P=0.08$ ). We observed no difference in implantation rate (CM 14/22, 67%; OHM 6/7, 71%; mixed 14/16, 88%), or ongoing pregnancy rate (CM 8/12, 67%; OHM 4/4, 100%; mixed 7/8, 88%), although more transfers are required to definitively answer this question.

**CONCLUSION:** This study has demonstrated that use of a medium formulated specifically to meet the needs of the oocyte during retrieval, ICSI and initial culture can increase the quality of blastocysts produced and the number of transferrable blastocysts in an IVF cohort.

P-189 Tuesday, October 23, 2012

**OPTIMIZING THE TEMPERATURE FOR EMBRYO CULTURE IN IVF: A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL (RCT) COMPARING STANDARD CULTURE TEMPERATURE OF 37°C TO THE REDUCED MORE PHYSIOLOGIC TEMPERATURE OF 36°C.** K. H. Hong,<sup>a,b</sup> E. J. Forman,<sup>a,b</sup> H. Lee,<sup>a</sup> K. M. Ferry,<sup>a</sup> N. Treff,<sup>a</sup> R. Scott.<sup>a</sup> <sup>a</sup>Reproductive Endocrinology, Reproductive Medicine Associates of New Jersey, Morristown, NJ; <sup>b</sup>Obstetrics, Gynecology & Reproductive Sciences, UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical School, New Brunswick, NJ; <sup>c</sup>Genetics, Rutgers-The State University of New Jersey, Piscataway, NJ.

**OBJECTIVE:** In most modern IVF laboratories, human oocytes and embryos are cultured at 37°C - human core temperature. While intuitive, the ideal temperature for in vitro embryo culture has not been determined. In fact, studies in animal models and humans suggest that ovarian follicles and fallopian tubes are typically at least 1°C cooler than core. According to Leese's "Quiet Embryo Hypothesis", preimplantation embryos may develop optimally at a less stressful reduced metabolic rate resulting from cooler in vivo temperatures. This study seeks to determine whether in vitro culture at 36°C results in improved blastulation and ultimately implantation.

**DESIGN:** Paired RCT.

**MATERIALS AND METHODS:** Patients were <age 42 with normal ovarian reserve. After retrieval, mature metaphase II oocytes (MIIIs) were randomized to culture at either 37°C or 36°C. All embryos were cultured to the blastocyst stage. Blasts underwent trophectoderm biopsy for aneuploidy screening and DNA fingerprinting. Developmental outcomes were compared. The study was powered to detect a 15% increase in blastulation rate ( $n=50$  cycles). After the first 10 cycles, an interim analysis was done to assure safety.

**RESULTS:** 169 MIIIs have been studied (37°C  $n=86$ , 36°C  $n=83$ ). Fertilization (80% vs 86%), cleavage (96% vs 94%), and blastulation (46% vs 40%) rates were equivalent. The proportion of oocytes becoming high-quality euploid blasts was also equivalent (28% vs 27%). The only observed difference was a reduction in day 3 cell number in the 36°C group consistent with the desired reduced metabolic rate ( $6.9 \pm 2.1$  vs.  $7.9 \pm 1.8$  cells,  $P<0.01$ ).

**CONCLUSION:** This RCT represents the first prospective evaluation of the optimal in vitro culture temperature for human embryos. Interim analysis finds no evidence of harm in lowering the culture temperature, so the RCT is proceeding to fully determine the impact of culture at a more physiologic level. The study is nearing completion with all data including DNA fingerprinting on the conceptuses to assess implantation rates soon to be available.

P-190 Tuesday, October 23, 2012

**GENE EXPRESSION AS BIOMARKERS OF QUALITY TO COMPARE CULTURE OF SYSTEM: SINGLE MEDIUM AND SEQUENTIAL MEDIA SYSTEM.** J. Polisseni,<sup>a,b,c</sup> F. Polisseni,<sup>b</sup> M. M. Pereira,<sup>c</sup> M. O. Guerra,<sup>a</sup> L. S. A. Camargo,<sup>c</sup> V. M. Peters.<sup>a</sup> <sup>a</sup>Center of Biology Reproduction, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil; <sup>b</sup>Assisted Reproduction, Clínica Pró-Criar/Monte Sinai, Juiz de Fora, MG, Brazil; <sup>c</sup>Animal Reproduction, Embrapa Dary Cattle, Juiz de Fora, MG, Brazil.

**OBJECTIVE:** Evaluate embryo development and gene expression (HSP70.1, PRDX, GLUT-1 and GLUT-5) of blastocysts that cultured in two different systems: single medium, and a sequential media system, utilizing bovine embryo as a model. We compared the results obtained with medium utilized in bovine embryo: CR2aa and SOF.

**DESIGN:** Prospective randomized study.

**MATERIALS AND METHODS:** 1040 cumulus oocyte-complexes were obtained from slaughterhouse ovaries, matured, and fertilized in vitro at 38.8°C with 95% humidified air and 5% CO<sub>2</sub>. After, the presumptive zygotes were semi-denuded and were distributed randomly across the groups for cultured: CR2aa (n=276), SOF (n=264), sequencial media system: ECM/Multi-blast - Irvine® (n=163) and single medium Global - Life Global® (n=284). Cleavage and blastocyst rate were evaluated. Real-time PCR was used for gene expression analysis on the blastocysts. Statistical differences between treatment groups were analyzed using the Chi square test. The quantification of gene expression was analyzed with REST® as Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST®. P values <0.05 were considered significant.

**RESULTS:** The evaluation of embryo development was not able to distinguish any difference of development amongst culture media from cleavage rate (72.1%, 76.1%, 74.0%, 76.4, respectively) thorough blastocyst rate (30.4%, 27.0%, 35.0% and 38.0%, respectively) in CR2aa, SOF, ECM/Multi-blast and Global, ( $P>0.05$ ). Although, Global medium produced higher ( $P<0.01$ ) expression of GLUT-1 and GLUT-5 compared with the ECM/multiblast. But neither sequencial and single medium were affect for expression of stress-responsive gene transcripts: HSP70.1 and PRDX.

**CONCLUSION:** Based on the embryo development the single media and sequential system was similar, but an expression of gene predicts that single media had a better performance because GLUTs was higher and energy metabolism plays an important role during preimplantation embryo development and could be used as biomarkers for the study embryo viability.

*Supported by:* FAPEMIG.

P-191 Tuesday, October 23, 2012

**BLASTOCYST DEVELOPMENT IN VITRO IS INFLUENCED BY COLONY STIMULATING FACTOR 3 (CSF3).** G. A. Thouas, M. Truong, N. J. Hannan, D. K. Gardner. Department of Zoology, Faculty of Science, The University of Melbourne, Melbourne, VIC, Australia.

**OBJECTIVE:** To determine the growth and differentiation effects of colony stimulating factor 3 (CSF3) on preimplantation embryo development, by testing it as a culture media supplement.

**DESIGN:** Recombinant CSF3 was added to embryo culture media designed for clinical IVF. Blastocyst development was then assessed using different mouse strains.

**MATERIALS AND METHODS:** Pronucleate oocytes were flushed from oviducts of female hybrid (B6CBAF1) mice, after ovarian stimulation and mating. Following denudation and rinsing, oocytes were cultured in precompaction medium (G1plus™) under standard conditions (37°C, 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>). After 48 hrs (Day 3) compacting embryos were then transferred to post-compaction medium (G2plus™) with 0.1-1000 ng/mL CSF3, cultured either singly (2μl drops) or in groups (10/20μl) to the blastocyst stage. At 96 hrs (Day 5) morphology and cell allocation to the inner cell mass (ICM) and trophectoderm were quantitated. The same experiment was repeated for Swiss outbred mice (1-100 ng/ml, Day 4 cultures) with the addition of time-lapse imaging. Analysis of variance and linear regression were applied to mean values.

**RESULTS:** For F1 mice, single embryo cultures with CSF3 resulted in blastocysts with increased hatching and increased cell numbers proportional to dosage, significant at 100ng/ml, a trend seen only in albumin-free media. Grouped embryos (at 100 ng/ml CSF3 & albumin) also formed blastocysts with higher cell numbers than negative controls (113 vs 102,  $P<0.001$ ) and with higher ICM numbers (30 vs 22,  $P<0.05$ ). For Swiss mice, no significant changes were seen in Day 4 blastocyst formation or cell number, although a significant increase in cavitation after 65 hours was seen (single embryo culture with CSF3 Day 3-4) compared to negative controls.

**CONCLUSION:** CSF3 appears to stimulate cell proliferation, differentiation and morpho-kinetics of blastocysts across two mouse strains. These effects may augment existing autocrine/paracrine regulatory processes.

*Supported by:* Vitrolife AB and The University of Melbourne.

P-192 Tuesday, October 23, 2012

**USE OF TIMELAPSE AND KINETIC MARKERS TO COMPARE TWO DIFFERENT ONE-STEP IVF CULTURE.** T. Trinh, N. Desai, J. Goldberg. Obstetrics and Gynecology/Women's Health Institute, Cleveland Clinic, Beachwood, OH.

**OBJECTIVE:** The timings of specific cellular events may be useful kinetic markers to discern differences in embryo growth patterns. This study uses

### 7.1.3 Abstract publicado no Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida - 2012

134

pacientes que se mantiveram eumenorréicas no t6mpq apresentavam níveis de HAM e CFA significativamente maiores no tzero.**CONCLUSÕES:**Todos marcadores mudaram significativamente com a ação gonadotóxica. Entretanto, a CFA foi o único marcador que não demonstrou mudança após as pacientes expostas à quimioterapia voltarem a ciclar. Assim, o HAM pode ser utilizado como marcador de reserva ovariana porque demonstra claramente queda em seus níveis, de forma mais fiel que o FSH, mesmo com ciclos menstruais regulares, porém, parece que a CFA pode ser mais fiel à RO por não sofrer modificações mesmo quando os ciclos menstruais voltam a ser regulares. CFA e HAM podem ser utilizados como preditores de gonadotoxicidade.**PALAVRAS-CHAVES:** hormônio antimülleriano, gonadotoxicidade, reserva ovariana, contagem de folículos antrais.

#### **P95 - Efetividade da proteína da clara de ovo em mulheres com risco elevado para síndrome da hiperestimulação ovariana grave**

Michelon J, Badalotti M, Badalotti F, Petracco A.

Fertilidad - Centro de Medicina Reprodutiva

**OBJETIVO:** Avaliar a eficácia do uso de claras de ovos de galinha na prevenção da forma grave da Síndrome da Hiperestimulação Ovariana (SHEO) em pacientes com risco elevado para a síndrome. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Quarenta e duas mulheres com alto risco para SHEO foram submetidas a FIV com protocolo longo. Vinte e duas delas (G1) usaram medidas preventivas com albumina humana 20g no dia da transferência e/ou menor dose de hCG e/ou Bromocriptina e não transferiram os embriões, os quais foram criopreservados e transferidos em ciclos futuros. As outras 20 mulheres (G2) usaram seis claras de ovos ao dia, divididas em três tomadas, a partir do quinto dia de estimulação até o dia do teste de gravidez, sem nenhuma outra medida adicional, e todas transferiram seus embriões. Os dados foram analisados estatisticamente pelos testes Qui-Quadrado e Exacto de Fisher. **RESULTADOS:** O número médio de folículos no G1 foi 46,9 e no G2 de 47,7. A taxa de fertilização foi semelhante entre os grupos (71% e 80%, respectivamente). A taxa de gravidez clínica, quando comparado embriões criopreservados do G1 e embriões frescos de G2, foi semelhante (45,5% e 40%, respectivamente). O diâmetro ovariano médio, uma semana depois da aspiração folicular, foi semelhante entre os grupos (8,2cm no G1 e 6,9cm no G2). A necessidade de visitas médicas para acompanhamento da SHEO, depois da punção folicular, foi significativamente menor ( $p<0,001$ ) no G2 (média de 3,4 visitas no G1 e 1,3 no G2). O desenvolvimento de SHEO grave (18% dos casos) foi exclusivo no G1 ( $p=0,004$ ). Todas as mulheres do G2, mesmo aquelas que engravidaram, tiveram ausência ou, no máximo, SHEO leve. SHEO moderada ocorreu em 18% das mulheres do G1. Nenhuma reação adversa ao uso das claras de ovos foi observada. **CONCLUSÕES:** O uso profilático de claras de ovos durante a FIV mostra-se eficaz e seguro na prevenção da SHEO grave em pacientes com alto risco para desenvolver a síndrome, mesmo na ocorrência de gravidez. Secundariamente, esta medida evita a transmissão de prions ou infecções virais como hepatites e HIV, relatados com o uso da Albumina Humana.

#### **P96 - Eficiência da vitrificação de embriões em haste utilizando papel filtro para remoção do excesso da solução crioprotetora**

Salvador Ra<sup>1</sup>; Frajblat M<sup>2</sup>; Amaral V L L<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UNIVALI- Universidade do Vale do Itajaí - Itajaí/SC; <sup>2</sup>UFRJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro/RJ

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da vitrificação de embriões murinos em haste utilizando papel filtro como método para a remoção do excesso da solução crioprotetora. Embriões de camundongo no estágio de 2 células foram expostos à solução crioprotetora VI-I (Ingámed®) por 12 minutos, sendo então transferidos para a solução VI-II (Ingámed®) e envasados em hastes de vitrificação (Vitri Ingá, Ingámed®). O excesso da solução crioprotetora foi removido por dois métodos: 1) com o auxílio de pipeta Pasteur de vidro estirada (grupo controle) e 2) com pequenas tiras de papel filtro estéril (grupo teste). As hastes foram então submersas em nitrogênio líquido. O tempo decorrido entre a exposição à solução VI-II e a imersão no nitrogênio líquido não excedeu 60 segundos. O aquecimento dos embriões foi realizado mergulhando as hastes diretamente em solução DV-I (Ingámed®) onde permaneceram por 1 minuto antes de serem transferidos para a solução DV-II (Ingámed®). Após 3 minutos foram lavados 2 vezes na solução DV-III( Ingámed®), por 5 minutos cada. Os embriões foram cultivados em placas de poliestireno (15x35mm, Ingámed®), em gotas de 30µL de meio (Global - Lifeglobal®, suplementado com SSS -Irvine Scientific®), cobertas com óleo mineral e previamente gaseificadas. O cultivo foi realizado em incubadora Thermo modelo 3110, com temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O desenvolvimento embrionário foi avaliado até o estágio de blastocisto expandido e os resultados analisados pelo teste  $\chi^2$  (chi-quadrado). Não foram observadas diferenças nas taxas de blastocisto expandido entre os grupos teste (93%) e controle (89%). Os resultados deste estudo sugerem que a utilização de tiras de papel filtro pode ser empregada na remoção do excesso da solução crioprotetora sem alterações dos resultados da técnica de vitrificação em haste.

#### **P97 - Utilização de genes biomarcadores para avaliação da qualidade de embriões cultivados em sistema de cultivo sequencial e único**

Polisseni, J<sup>1,2,3</sup>; Polisseni, F<sup>3</sup>; Munck, Mp<sup>2</sup>; Guerra, Mo<sup>1</sup>; Camargo, Lsa<sup>2</sup>; Peters, Vm<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biologia da Reprodução - Ufjf; <sup>2</sup>Embrapa Gado de Leite; <sup>3</sup>Clinica Pró-Criar/Monte Sinai

**OBJETIVO:** Comparar os sistemas de cultivo único e sequencial através da avaliação do desenvolvimento embrionário e expressão dos genes facilitadores do transporte de glicose 1 e 5 (Glut-1 e Glut-5) e relacionados ao estresse celular (Hspa 70.1 e Prdx), utilizando embrião bovino como modelo experimental. **METODOLOGIA:** Complexos cumulus-oócitos ( $n=1040$ ) foram obtidos de ovários de matadouro, madurados e fertilizados in vitro. Os

zigotos obtidos foram semi-desnudados e distribuídos, aleatoriamente, entre os grupos de cultivo CR2aa ( $n = 276$ ), SOF ( $n = 264$ ) (meios conhecidos no cultivo de embriões bovinos), sistema de cultivo seqüencial: ECM / Multiblast - Irvine® ( $n = 163$ ) e sistema de cultivo único: Global - Life Global® ( $n = 284$ ). As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas. Utilizou-se PCR em tempo real para análise da expressão dos genes nos blastocistos. As diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento foram analisados pelo teste qui-quadrado. A quantificação da expressão dos genes foi avaliada pelo software Relative Expression Software Tool (REST®) através do Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST®. Valores  $p < 0,05$  foram considerados significativos. **RESULTADOS:** Não ocorreu diferença ( $P > 0,05$ ) na taxa de clivagem entre os grupos (72,1%, 76,1%, 74,0%, 76,4%, respectivamente para CR2aa, SOF, meio seqüencial ECM/Multiblast®, e meio único Global®). Também não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na produção de blastocisto entre os grupos (30,4%, 27,0%, 35,0% e 38,0%), no oitavo dia de cultivo. Entretanto houve diferença na expressão dos genes importantes no desenvolvimento embrionário. Os sistemas de cultivo único e seqüencial, quando comparados entre si, não foram influenciados pela expressão de transcritos de genes em resposta ao estresse: Hsp70.1 e Prdx. Já o Glut-1 e o Glut-5 apresentaram uma maior expressão de transcritos ( $P < 0,05$ ) no sistema único de cultivo, sugerindo a melhor qualidade dos embriões neste sistema, quando comparado com o sistema de cultivo seqüencial. **CONCLUSÃO:** Em relação ao desenvolvimento embrionário, os sistemas de cultivo foram semelhantes. De acordo com a expressão genética, o sistema de cultivo único apresentou-se superior, pois os gluts são moléculas reguladoras do desenvolvimento embrionário. Eles poderiam ser utilizados como biomarcadores para o estudar a viabilidade do embrião.

#### **P98 - Aspécitos bioéticos sobre o destino dos embriões criopreservados nas clínicas de reprodução**

Girlene Celestina de Jesus, Lucialda Dias Lopes Chaves, Marcelle Reis Miranda, Paulo Franco Taitson

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - PUC Minas.

**OBJETIVO:** Perceber aspectos bioéticos em relação ao destino de embriões criopreservados na literatura internacional. **MATERIAL E MÉTODOS:** Pesquisa exploratória tendo como fonte de consulta, pesquisa na base de dados do MEDLINE. Os descriptores selecionados foram: Unused embryos and bioethics, bioethics and assisted reproduction. Período da pesquisa: Publicações de 2000 à 2010. **RESULTADOS:** A partir desta busca, foram encontrados 115 artigos. Os dados mostraram que em 93,91% dos estudos existe uma preocupação real por parte dos pesquisadores quanto ao destino dos embriões congelados. No entanto, é discutível o que fazer com estes embriões. Nos estudos envolvidos, a preocupação ética esteve presente tanto para médicos, biólogos e enfermeiros. **CONCLUSÃO:** É notória a preocupação dos pesquisadores sobre o destino dos embriões congelados em clínicas de reprodução humana. Atualmente sabe-se que o Brasil é um dos países com o maior número de embriões nestas condições. Com a Lei nº 8.974, a Lei de Biossegurança

e a Resolução nº 1358 da ANVISA, mostra-se premente uma mudança de postura no Brasil quanto a necessidade e a responsabilidade de se congelar embriões.

#### **P99 - Início tardio da gravidez. Tendência atual das mulheres?**

Danielle Miranda Barbosa, Samara Lima de Oliveira, Cristiane Neiva Carvalho Dilly, Ana Paula Lopes Dumont Amorimino, Paulo Franco Taitson

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - PUC Minas

**OBJETIVOS:** Discutir o aumento da média de idade das mulheres que procuram tratamento de infertilidade. **MATERIAL E MÉTODOS:** Trata-se de uma pesquisa na base de dados do MEDLINE, no período de 2002 a 2010 com os seguintes descriptores: assisted reproduction, age and assisted reproduction.

**RESULTADOS:** Foram encontrados 36 artigos que definiram o horizonte de estudo. A idade da mulher e as possíveis alterações fetais decorrentes deste quesito foram evidentes em 97% dos estudos.

**CONCLUSÃO:** Mesmo reconhecendo a possibilidades de alterações morfológicas fetais e gravidez de risco após os 40 anos, torna-se preocupante observar que cada vez mais as mulheres tem retardado a gravidez. Independência financeira, realização profissional e casamento tardio são os principais indicadores.

#### **P100 - A bioética e o diagnóstico genético pré-implantacional (PGD)**

Grazielle A. Silva Rodrigues, Isabela Pereira Silva, Joyce de Carvalho Xavier, Nívea Evangelista Rocha, Paulo Franco Taitson

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - PUC Minas

**OBJETIVOS:** Na atualidade, os casais vivem o seguinte paradigma: prosseguir com o tratamento da infertilidade conjugal mesmo após descobrir através do Diagnóstico Genético pré-implantacional que embriões provenientes da reprodução assistida tem alguma anomalia genética ou optar por não levar adiante o tratamento. **MATERIAL E MÉTODOS:** Trata-se de uma busca na base de dados do MEDLINE, no período de 2004 a 2011 com os seguintes descriptores: assisted reproduction, preimplantation genetic diagnosis and bioethics. **RESULTADOS:** Foram selecionados 64 artigos para o estudo. Em 92,18% dos estudos observou-se a dificuldade dos casais em definir se levam adiante o tratamento da infertilidade. Quanto mais velho era o casal e maior o tempo de infertilidade, a dúvida mostrou-se mais evidente (95%). **CONCLUSÃO:** Existe ainda uma dificuldade substancial dos casais em reconhecer o Diagnóstico Genético Pré-Implantacional como uma técnica eticamente aceitável.

#### **P101 - Atuação do enfermeiro na prevenção da síndrome de hiperestimulação ovariana**

Thiago dos Santos Pimenta, Darlene B. Lamiim, Natália Costa Laurindo, Ana Paula Sousa, Paulo Franco Taitson

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - PUC Minas.

7.1.4 Trabalho submetido ao Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida – 2013

## SINGLE MEDIUM AND SEQUENTIAL MEDIA CULTURE SYSTEMS IN TWO EXPERIMENTAL MODELS: BOVINE AND RAT

Juliana Polisseni<sup>a,b,c</sup>, Martha de Oliveira Guerra<sup>b</sup>, João Gabriel Viana de Grázia<sup>b</sup>, Wanderlei Ferreira de Sá<sup>a</sup>, Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>a</sup>, Larissa Cabral Milen<sup>b</sup>, Vera Maria Peters<sup>b</sup>

**Objetivo:** Avaliar o desenvolvimento embrionário de blastocistos cultivados em sistema de cultivo único e sequencial utilizando embriões bovinos e de rato como modelos experimentais. **Métodos:** Para bovinos: 840 complexos címulos-ovócitos foram obtidos de ovários, e, em seguida, maturados e fertilizados *in vitro*. Zigotos foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos para cultivo: Charles Rosenkrans 2 (CR2aa) ( $n = 235$ ), sistema seqüencial (G1/G2) ( $n = 228$ ), sistema seqüencial (ECM/Multiblast) ( $n = 233$ ) e sistema único (Global) ( $n = 165$ ). No terceiro dia após a inseminação a taxa de clivagem foi avaliada e embriões 8-16 células de todos os grupos foram biopsiados e retornados ao cultivo no sistema “well on the well”. A taxa de blastocisto foi avaliada 192 horas após a fertilização. Para o modelo experimental rato: ratas Wistar ( $n = 18$ ) foram superovuladas com PMSG seguido de hCG. Os embriões foram coletados 48 horas após a administração de hCG. Os embriões foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos para cultivo: KSOM ( $n = 96$ ), sistema sequencial (ECM/Multiblast) ( $n = 233$ ) e sistema único (Global) ( $n = 149$ ). A taxa de blastocisto foi avaliada. Diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste do qui-quadrado. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo. **Resultados:** Taxas de blastocisto e clivagem foram semelhantes em sistema de cultivo único e sequencial para embriões bovinos biopsiados. Contudo a

taxa de blastocisto foi menor para os meios sequenciais e a taxa de blastocisto expandido foi maior em meio único, comparando com o meio sequencial ( $P < 0,001$ ), no modelo de rato. **Conclusões:** O cultivo de embriões em meio único foi similar ao meio seqüencial em embriões bovinos de 8-16 células biopsiados. No entanto o meio único apresentou resultados mais satisfatórios do que o meio sequencial em embriões de ratos intactos. A diferença da qualidade dos sistemas de cultivo somente é observada quando não se faz nenhum tipo de seleção embrionária.

Palavras-chave: Sistema de cultivo, meio unico, meio sequencial.

## 7.2 Artigos ratos

7.2.1 Trabalho aceito para publicação no Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida - 2013

### "IMPACT OF THE USE OF GONADOTROPINS ON EMBRYONIC DEVELOPMENT – A RAT MODEL"

**Assunto:** aceitação de trabalho  
**De:** "JBRA Assisted Reproduction Assisted Reproduction" <jbraassistedreproduction@gmail.com>  
**Data:** Dom, Fevereiro 24, 2013 6:45 pm  
**Para:** jupol@powermail.com.br  
**CC:** "Paulo F. Taitson" <pftaitson@bol.com.br>  
**Prioridade:** Normal  
**Opcões:** Ver cabeçalho completo | Ver Versão para Impressão | Baixar como um arquivo | Esconder imagens com problema

Dear Dr Juliana Polisseni and other authors

We are pleased to announce that the original work:

\*IMPACT OF THE USE OF GONADOTROPINS ON EMBRYONIC DEVELOPMENT – A RAT MODEL  
\*

has been accepted for publication in JBRA Assisted Reproduction..

Sincerely.

Maria do Carmo Souza B  
Editor

Paul F Taitson  
Co-ed

\*Please consider the new e-mail address to other submissions

Alpha

## IMPACT OF THE USE OF GONADOTROPINS ON EMBRYONIC DEVELOPMENT – A RAT MODEL

*Juliana Polisseni<sup>a, b, c</sup>, João Gabriel Viana de Grázia<sup>b</sup>, Martha de Oliveira Guerra<sup>b</sup>,  
Larissa Cabral Milen<sup>b</sup>, Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>a</sup>, Vera Maria Peters<sup>b</sup>*

### RESUMO:

**Objetivo:** Avaliar o impacto da superovulação sobre o desenvolvimento embrionário inicial em ratos. **Métodos:** Experimento 1: Ratas Wistar foram superovuladas com PMSG seguido de hCG 48 horas depois. Os embriões foram coletados 24 h após a administração de hCG. Experimento 2: ratas Wistar ( $n = 16$ ) foram distribuídas entre os grupos controle e superovulado. Os embriões foram coletados 48 e 72 h após a administração de hCG. O número total de estruturas embrionárias e o grau de qualidade de embriões foram analisados pelo teste de Qui-quadrado. Já a diferença dos pesos dos ovários foi avaliada pelo teste t de Student. **Resultados:** Experimento 1: 931 embriões foram coletados de 66 animais, com média de  $16,3 \pm 9,5$  estruturas por animal. A superovulação foi bem sucedida em 89,4% dos animais, e 98,2% dos embriões obtidos a partir de animais superovulados foram viáveis. Experimento 2: O grupo superovulado apresentou ovários com maior peso, um maior número de embriões ( $P <0,001$ ), quando comparado com o grupo controle. No entanto, os embriões do grupo superovulado apresentaram menor número de células em 72 horas após a administração de hCG ( $P <0,001$ ). A maior porcentagem de embriões do grupo superovulado foi classificada como grau I ou II em relação aos embriões do grupo controle ( $P <0,001$  e  $P = 0,008$ , respectivamente). **Conclusão:** A superovulação foi bem sucedida no modelo rato e resultou em um maior número de embriões coletados, por animal. Entretanto, embriões produzidos de ratas superovuladas apresentaram um desenvolvimento mais lento.

**Palavras-chave:** superovulação, o desenvolvimento do embrião, grau embrião, modelo animal

**7.2.2 Trabalho publicado na Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais  
- 2009**

---

110

**ARTIGO ORIGINAL**

## TÉCNICA DE TUNEL EM EMBRIÕES DE RATAS WISTAR: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E DA CAPACIDADE DE DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES

*TUNEL TECHNIQUE IN WISTAR RATS EMBRYOS: EVALUATION OF QUALITY AND  
DEVELOPMENT CAPACITY OF EMBRYOS*

*Juliana Polisseni\*, Raquel Varela Serapião\*\*, Paulo Henrique de Almeida Campos Júnior\*\*\*, João Gabriel Viana de Grázia\*\*\*\*, Larissa Cabral Milen#, Luis Sérgio de Almeida Camargo##, Martha de Oliveira Guerra##, Vera Maria Peters###*

**RESUMO**

A técnica do TUNEL tem se mostrado eficiente como indicadora de qualidade embrionária em embriões bovinos e de camundongos. Entretanto, em ratos, a técnica não é amplamente utilizada. Objetivou-se avaliar a qualidade do desenvolvimento de embriões de ratas Wistar e o uso da técnica de TUNEL. Animais (n=8) foram superovulados através da injeção intraperitoneal de 150 UI/kg de peso via intraperitoneal (IP) de PMSG (Pregnant Mare Gonadotropin) e de 75 UI/kg de hCG 48h após. Fêmeas superovuladas foram colocadas para acasalar. 107 embriões de 4-8 células foram coletados 72 horas após hCG e cultivados em meio KSOM com 5% albumina sérica humana (BSA), em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>, 95% de umidade a 37,0°C, por 48 horas. Após o cultivo, foi calculada a taxa de blastocisto e realizada a técnica do TUNEL. A taxa de blastocisto foi de 83,17% (89/107), com 19,62% (21/107) de blastocisto inicial, 14,01% (15/107) de blastocisto, e 49,53% (53/107) de blastocisto expandido. O número total de blastômeros foi de 28,82±4,76. A taxa apoptótica foi de 10,32 ± 8,91% e 94% (31/34) dos embriões apresentavam pelo menos uma célula apoptótica. Em conclusão, a técnica de TUNEL se mostrou viável na avaliação da qualidade embrionária de embriões de ratas Wistar.

**PALAVRAS - CHAVE**

Blastocisto. apoptose. desenvolvimento embrionário. TUNEL.

**ABSTRACT**

The TUNEL technique has proven to be efficient as indicator of embryo quality in cattle and mice. Although the technique is not yet widely used in rats. Thus the aim of this study was to evaluate the quality of Wistar rat embryos and the use of the TUNEL technique. Animals (n=8) were superovulated by intraperitoneal injection of 150 IU/kg PMSG (Pregnant Mare Gonadotropin) and 75 IU/kg 48h after hCG. Superovulated females were placed with males at a ratio of 1/1. 107 4-8 cells embryos were collected 72 hours after hCG and were cultured in KSOM medium with 5% bovine serum albumin (BSA), for 48h ,with 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidity at 37,0°C. After cultured, the blastocyst rate was calculated and the TUNEL technique was performed. The blastocyst rate was 83.17% (89/107), with 19.62% (21/107) of initial blastocyst, 14.01% (15/107) of blastocyst and 49.53% (53 / 107) of expanded blastocyst. The total number of blastomeres was 28.82 ± 4.76. The apoptotic cells rate was 10.32 ± 8.91% and 94% (31/34) of embryos had at least one apoptotic cell. In conclusion, the TUNEL technique showing that it can be used to evaluation embryo quality, in Wistar rats embryos.

**KEY WORDS**

Blastocyst. apoptotic. embryo development. TUNEL.

\* Doutoranda do curso de Pós-graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), jupol@powermail.com.  
 \*\* Pesquisador da Embrapa Gado de Leite do Laboratório de Reprodução Animal, rscrapis@yahoo.com.br.  
 \*\*\* Estagiário do laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, phacj@ig.com.br.  
 \*\*\*\* Estagiário do Centro de Biologia da Reprodução, UFJF, jjgrazia@gmail.com.  
 # Estagiário do Centro de Biologia da Reprodução, UFJF, larissamilen@yahoo.com.br.  
 ## Pesquisador da Embrapa Gado de Leite do Laboratório de Reprodução Animal, camargo@cnpgl.embrapa.br.  
 ### Pesquisador do Centro de Biologia da Reprodução Animal,UFJF, martha.guerra@ufjf.edu.br.  
 #####Pesquisador do Centro de Biologia da Reprodução Animal,UFJF, Peters.vera@ufjf.edu.br.  
 Correspondence author: Juliana Polisseni, Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro de Biologia da Reprodução, Campus Universitário, Caixa Postal 328, CEP 36001-970, Juiz de Fora, MG - Brasil. jupol@powermail.com.  
 Received: 18/06  
 Accepted: 11/08

**1 INTRODUÇÃO**

O desenvolvimento da biologia molecular tem propiciado uma melhor compreensão dos mecanismos biológicos celulares. A apoptose, forma programada de morte celular, é um processo de regulação de populações e linhagens celulares nos sistemas de mamíferos. É caracterizada por fragmentação citoplasmática e nuclear, condensação de cromatina e fagocitose (VANDAELE et al., 2007).

Uma técnica que tem se mostrado eficiente na marcação de células apoptóticas embrionárias é o TUNEL. Esta consiste na utilização da enzima terminal deoxinucleotidil transferase (TdT) – mediated d-UTP nick end-labeling, que promove a ligação da

## 8 COMENTÁRIOS GERAIS

### 8.1 Modelo experimental bovino

- O sistema de cultivo único com o meio Global® apresentou-se mais apropriado para o desenvolvimento dos embriões íntegros quando comparado com o sistema de cultivo sequencial com ECM®/Multiblast® (maior proporção de embriões com 8-16 células, aumento na taxa de blastocisto e maior proporção de embriões no estádio de blastocisto expandido) (experimento 1).

- O sistema de cultivo único com o meio Global® apresentou-se semelhante para o desenvolvimento dos embriões biopsiados quando comparado com o sistema de cultivo sequencial com ECM®/Multiblast® e G1®/G2® (experimento 2) .

- O sistema de cultivo único proporcionou resultados similares de produção de blastocisto quando comparado com meios utilizados rotineiramente para o modelo experimental em questão (CR2aa and SOFaa).

- Diferença na expressão de genes associados ao estresse e transportadores de glicose foi detectado quando se cultivou embriões em meios de cultivo distintos, demonstrando que componentes dos meios de cultivo podem induzir maior ou menor expressão dos genes estudados.

- A menor expressão de genes associados com estresse, como *HSP70.1* e *PRDX1*, observadas em meios de cultivo único e sequencial, indicam melhor condição de desenvolvimento embrionário *in vitro* do que os meios de cultivo utilizados para bovinos, provavelmente devido à presença de antioxidantes em sua composição.

- A diferença na expressão gênica não está necessariamente associada com a produção de blastocisto, mas indica que alterações moleculares estão presentes nos embriões.

## **8.2 Modelo experimental rato**

- A superovulação pode ser utilizada de forma satisfatória no modelo de ratas Wistar para aumentar o número de embriões produzidos por animal (experimento 1).

- A superovulação causou atraso no desenvolvimento embrionário sem comprometer a qualidade embrionária (experimento 2).

- Os resultados indicam a possibilidade de se realizar a avaliação da qualidade embrionária de embriões de ratas Wistar através da produção de blastocisto e número de células apoptóticas pela técnica de túnel (experimento 3).

- O sistema de cultivo único apresentou melhor capacidade de desenvolvimento embrionário, quando comparado com o sistema de cultivo sequencial (maior taxa de blastocisto) (experimento 4).

## 9 CONCLUSÕES

A qualidade dos blastocistos íntegros bovinos e de ratos é aumentada quando se utiliza o sistema de cultivo único no período de pre-implantação.

A hiperestimulação por gonadotrofinas pode ser utilizada de forma satisfatória para aumentar o número de embriões produzidos pelas ratas Wistar.

A técnica de túnel pode ser utilizada para avaliação da qualidade de embriões de ratas Wistar.

## 10 REFERÊNCIAS

AHUMADA, A.; OLMEDO, S. B.; LIEBERMANN, J.; MAURI, A. L.; MEDINA, R.; POSADA, M. N.; ROBLERO, L.; ROSEMBERG, E. et al. Procedimentos de Reprodução Assistida. In: Franco JG Jr (ed) **Manual de procedimentos. Laboratório de Reprodução Assistida**. REDLARA, São Paulo, v. 1, p. 29–48, 2006.

AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.390-396, 2002.

AZADBAKHT, M.; VALOJERD.I, M. R. Development of vitrified-warmed mouse embryos co-cultured with polarized or non-polarized uterine epithelial cells using sequential culture media. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 25, p. 251-261, 2008.

BALASUBRAMANIAN, S.; SON, W. J.; MOHANA, B. K.; OCK, S. A.; YOO, J. G.; IM, G. S. et al. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v. 68, p.265–275, 2007.

BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL, G. E. Jr. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 74, n.11, p.1406–1418, 2007.

BATISTA, L. A. A.; BATISTA, N. T.; LIMA, D. V. Indução da ovulação. In: **Tratado de Reprodução Assistida**, São Paulo, Segmento Farma, 2010, p. 213-230.

BAUMANN, C. G.; MORRIS, D. G.; SREENAN, J. M.; LEESE, H. J. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. **Mol Reprod Dev**, v.74, p.1345–1353, 2007.

BAVISTER, B. D.; LEIBFRIED, M. L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biol Reprod**, v. 28, p.235–247, 1983.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Hum Reprod Update**, v.1, p.91-148, 1995.

BEN-YOSEF, D.; AMIT, A.; AZEM, F.; SCHWARTZ, T.; COHEN, T.; MEI-RAZ, N.; CARMON, A.; LESSING, J. B.; YARON, Y. Prospective Randomized Comparison of two embryo culture systems: P1 Medium by Irvine Scientific and Cook IVF Medium. **J Assist Reprod Genet**, v. 21, p.291–295, 2004.

BERTOLINI, N.; BEAM, S. W.; SHIM, H.; BERTOLINI, L. R.; MOYER, A. L.; FAMULA, T. R. et al. Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 63, p.318–328, 2002.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, Cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H<sub>2</sub>a during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. **Mol Reprod Dev**, v.73, p.267–278, 2006.

BIGGERS, J. D. Thoughts on embryo culture conditions. **RBM on line**, v. 4, p.30–38, 2001.

BIGGERS et al., 1967 apud SUMMERS, M.C.; BIGGERS, J. D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. **Hum Reprod Update**, v. 9, p.557–582, 2003.

BIGGERS, J. D.; MCGINNIS, L. K.; SUMMERS, M. C. Discrepancies between the effects of glutamine in cultures of preimplantation mouse embryos. **Reprod BioMed Online**, v. 9, p. 70-73, 2004.

BYRNE, A. T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H. J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal Reproduction and Fertility**, Manchester, v. 117, n. 1, p. 97-105, 1999.

CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M.; ARAÚJO, M. C. C. Taurina no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p.396-404, 2002.

CAMARGO, L. S. A.; POWELL, A. M.; VALE FILHO, V. R.; WALL, R. J. Comparison of gene expression in individual preimplantation bovine embryos produced by in vitro fertilisation or somatic cell nuclear transfer. **Reprod Fertil Dev**, v. 17, p.487–96, 2005.

CAMARGO, L. S. A.; BOITE, M. C.; WOHLRES-VIANA, S.; MOTA, G. B.; SERAPIAO, R. V.; SA, W. F.; VIANA, J. H. M.; NOGUEIRA, L. A. G. Osmotic challenge and expression of Aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. **Cryobiology**, v. 63, p.256-262, 2011.

CAMARGOS, A. F.; MELO, V. H. **Ginecologia Ambulatorial**. Belo Horizonte: Coopmed, 2001.

CHUANG, M.; ZAPATINS, A.; TAYLOR, M.; JINDAL, S. K.; NEAL-PERRY, G. S.; LIEMAN, H. J.; POLOTSKY, A. J. Prolonged gonadotropin stimulation is associated with decreased ART success. **J Assist Reprod Genet**, v. 27, p.711–717, 2010.

CIRAY, H. N.; AKSOY, T.; GOKTAS, C.; OZTURK, B.; BAHCCI, M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media - a sibling oocyte study. **J Assist Reprod Genet**, v. 29, p.891–900, 2012.

COELHO, E. R.; VALLE, M.; SAMPAIO, M.; GERBER, S. Metabolismo Embrionário no Período Pré-implantação. **Femina**, v. 34, n. 8, p. 551-557, 2006.

COMBELLES, C. M. H.; ALBERTINI, D. F. Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse. **Biol Reprod**, v. 21, p.812–821, 2003.

CORREA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C. D. et al. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, 2007.  
(doi:10.1016/j.anireprosci.2007.02.002).

COUTINHO, L. L.; REGITANO, L. C. A. Introdução à análise de marcadores moleculares. In: **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. 1 ed. Brasília-DF: Embrapa, p. 11-24, 2001.

DELHANTY, J. D. A.; HANDYSIDE, A. H. The origin of genetic defects in the human and their detection in the preimplantation embryo. **Human Reproduction**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 201-215, 1995.

DODE, M. A.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões na espécie bovina. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 26, p.32-37, 2002.

EDWARDS, R. G.; BRODY, S. A. **Assisted Human Reproduction**. Philadelphia: W. B. Saunders, p.677, 1995.

EL HAJJ, N.; HAAF, T. Epigenetic disturbances in *in vitro* cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. **Fertil Steril**, v. , p. , 2013. (1:10 doi:0015-0282).

ERBACH, G. T.; LAWITTS, J. A.; PAPAIOANNOU, V. E.; BIGGERS, J. D. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. **Biol Reprod**, v. 50, p. 1027-1033, 1994.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, n. 7, v.65, p. 178-191, 2006.

FEUGANG, J. M.; CAMARGO-RODRÍGUEZ, O.; MEMILI, E. Culture systems for bovine embryos. **Livestock Science**, v. 121, p.141–149, 2009.

FIORENZA, M. T.; BEVILACQUA, A.; CANTERINI, S. et al. Early transcriptional activation of the Hsp70.1 gene by osmotic stress in one-cell embryos of the mouse. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1606-1613, 2004.

FRANCO JUNIOR, J. G.; BARUFI, R. L. R.; MAURI, A. L. **Reprodução Assistida**. São Paulo: Zass, 2004.

GARCIA-GARCIA, R. M.; WARD, F.; FAIR, S. et al. Development and quality of sheep embryos cultured in comercial G1.3/G2.3 sequential media. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 233-240, 2007.

GENBANK DATABASE :<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessado em 18 de junho de 2010.

GHAEMI, S. R.; SALAHNIA, M.; VALOJERDI, M. R. The effect of progesterone and exogenous gonadotropin on preimplantation mouse embryo development and implantation. **Exp Anim**, v.57, p.27–34, 2008.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. **CAB International**, Wallingford, 1994.

HAWK, H. W.; WALL, R. J. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. **Theriogenology**, v. 41, p.1571–1583, 1994.

HENTEMANN, M.; BERTHEUSSEN, K. New media for culture to blastocyst. **Fertility and Sterility**, v. 91, p. 878-883, 2009.

HENTEMANN, M.; MOUSAVI, K.; BERTHEUSSEN, K. Differential pH in embryo culture. **Fertility and Sterility**, v. , n. , p., 2010.(doi:10.1016/j.fertnstert.2010.10.018)

HILL, D. L. Ten years of preimplantation genetic diagnosis – aneuploidy screening: review of a multicenter report. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 82, n. 2, p.300-301, 2004.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p.683-700, 1999.

HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, p. 675-85, 2003.

IMMENSCHUH, S.; BAUMGART-VOGT, E. Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, p.786-777, 2005.

JACOB, S.; MOLEY, K. H. Gametes and embryo epigenetic reprogramming affect developmental outcome: implication for assisted reproductive technologies. **Pediatr Res**, v. 58, n. 3, p.437-446, 2005.

KADER, A.; AGARWAL, A.; ABDELRAZIK, H.; SHARMA, R. K.; et al. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. **Fertility and Sterility**, Torrance, v. 91, n. 5, p. 2087-2094, 2009.

KAGABU, S.; UMEZU, M. Variation with age in the numbers of ovulated ova and follicles of Wistar-Imamichi adult rats superovulated with eCG-hCG. **Exp Anim**, v. 55, p.45–48, 2006.

KELKAR, R. L.; DHARMA, S. J.; NANDEDKAR, T. D. Expression of Fas and Fas ligand protein and mRNA in mouse oocytes and embryos. **Reproduction**, Mumbai, v. 126, n. 6, p. 791-799, 2003.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. **Theriogenology**, v. 54, p. 313–26, 2000.

KIPMEN-KORGUN, D.; BILMEN-SARIKCIOLU, S.; ALTUNBAS, H.; DEMIR, R.; KORGUN, E. T. Type-2 diabetes down-regulates glucose transporter proteins and genes of the human blood leukocytes. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 69, n.3, p.350-358, 2009.

KON, H.; TOHEI, A.; HOKAO, R.; SHINODA, M. Estrous cycle stage-independent treatment of PMSG and hCG can induce superovulation in adult Wistar-Imamichi rats. **Exp Anim**, v. 54, p.185–187, 2005.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. **J Reprod Fertil**, v.102, p. 305-312, 1994.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. **Biol Reprod**, v. 62, p.16-22, 2000.

LANE, M.; GARDNER, D. K.; HASLER, M. J.; HASLER, J. F. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. **Theriogenology**, v. 60, p.407–419, 2003.

LEE, J.S.; SEO, J. S. Differential expression of two stress-inducible hsp70 genes by various stressors. **Exp Mol Med**, v. 34, n. 2, p.131-136, 2002.

LEESE, H. J.; CONAGHAN, J.; MARTIN, K. L.; HARDY, K. Early human embryo metabolism. **Bioessays**, v. 15, p. 259-264, 1993.

LEWIS et al., 1911 apud SUMMERS, M. C.; BIGGERS, J. D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. **Hum Reprod Update**, v. 9, p.557–582, 2003.

LI, C. Y.; LEE, J. S.; KO, Y. G. et al. Heat Shock Protein 70 Inhibits Apoptosis Downstream of Cytochrome c Release and Upstream of Caspase-3 Activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p.25665–25671, 2000.

LIM, K. T.; JANG, G.; KO, K. H.; LEE, W. W.; PARK, H. J.; KIM, J. J.; LEE, S. H.; HWANG, W. S.; LEE, B. C.; KANG, S. K. Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media **Theriogenology**, v. 67, p.293-302, 2007.

LUFT, J. C.; DIX, D. J. Hsp70 expression and function during embryogenesis. **Cell Stress Chaperones**, v. 4, n.3, p.162-70, 1999.

MAKAREVICH, A. V.; MARKKULA , M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. **Biology of Reproduction**, Nitra, v. 66, n. 2, p. 386-392, 2002.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M. A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Mol Reprod Dev**, v. 73, p.1367–1379, 2006.

NAGY, Z. P.; GRECO, E. Construção do laboratório de Fertilização *in vitro*. In: **Tratado de Reprodução Assistida**, São Paulo, Segmento Farma, 2010, p.295-309.

NEUMANN, C. A.; KRAUSE, D. S.; CARMAN, C. V.; DAS, S.; DUBEY, D. P.; ABRAHAM, J. L.; BRONSON, R. T.; FUJIWARA, Y.; ORKIN, S. H.; VAN ETEN, R. A. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. **Nature**, v. 424, n. 6948, p.561-565, 2003.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v.53, p.21–34, 2000.

NOVAIS, C. M., PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciêntica e desenvolvimento**, v. 33, p 10-13, 2004.

OLIVEIRA, A. T. D.; LOPES, R. F. F.; RODRIGUES, J. I. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro under varying embryo density conditions. **Theriogenology**, v. 64, p.1559–1572, 2005.

ORSI, N. M.; LEESE, H. J. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. **Mol Reprod Dev**, v. 59, n. 1, p.44-53, 2001.

PALASZ, A. T.; BELTRAN, B. P.; MARTINEZ, M. F.; PEREZ-GARNELO, S. S.; RAMIREZ, M. A. Development, molecular composition and freeze tolerance of bovine embryos cultured in TCM-199 supplemented with hyaluronan. **Zygote**, v. 16, p.39–47, 2008.

PANTALEON, M.; KAYE, P.L. Glucose transporters in preimplantation development. **Rev reprod**, v.3, p.77–81, 1998.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25,p.591–600, 1986.

PASSOS, E. P. History of assisted reproduction: lessons learned and future challenges. **Reviews in Gynaecological Practice**, Bristol, v. 4, p. 199-202, 2004.

PAULA-LOPES, F. F.; CHASE, C. C. JR.; AL-KATANANI, Y. M. et al. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v. 125, p. 285-294, 2003.

PEDERSEN, M. E.; OZDAS, O. B.; FARSTAD, W. et al. Effects of bovine oviduct epithelial cells, fetal calf serum and bovine serum albumin on gene expression in single bovine embryos produced in the synthetic oviduct fluid culture system. **Reprod Fertil Dev**, v.17, p.751-757, 2005.

PERIN, P. M.; MALUF, M.; FOLTRAN, DAN.; JANUARIO, B.; SALDIVA, P. H. N. Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization mouse model. **Fertil Steril**, v. 90, p.1503–1510, 2008.

PETERSON, C. Implantation failures: success of assisted hatching with quarter - laser zone thinning. **Reproductive BioMedicine Online Webpaper**, Cambridge, v.10, n. 2, p. 224-229, 2004.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFL, L. Relative expression software tool (REST<sup>®</sup>) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p.26–36, 2002.

POLISSENI, J.; SÁ, W. F.; GUERRA, M. O.; MACHADO, M. A.; SERAPIÃO, R. V.; CARVALHO, B. C. et al. Post-biopsy bovine embryo viability and whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. **Fertil Steril**, v. 93, p.783–788, 2010.

PURCELL, S. H.; MOLEY, K. HGluucose transporters in gametes and preimplantation embryos. **Cell press**, v. 20, p.483–89, 2009.

PURPERA, M. N.; GIRALDO, A. M.; BALLARD, C. B.; HYLAN, D.; GODKE, R. A.; BONDIOLI, K. R.. Effects of culture medium and protein supplementation on mRNA expression of in vitro produced bovine embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 76, p.783-793, 2009.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett**, v.339, p.62–66, 2003.

RAMOS, A. A.; POLISSENI, J.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; CAMARGO, L. S. A.; FOLHADELLA, D. S.; NOGUEIRA, L. A. G. Efeito do transporte no desenvolvimento de embriões bovinos cultivados *in vitro* a fresco ou reaquecidos após vitrificação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n.6, p. 2285-2289, 2006.

REED, M. L.; HAMIC, M. A.; THOMPSON, D. J.; CAPERTON, C. L. Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study. **Fertil Steril**, v. 92, p.1783–1786, 2009.

REZK, Y.; HUFF, C.; RIZK, B. Effect of glutamine on preimplantation mouse embryo development in vitro. **A J Obst Gyn**, v. 190, p.1450–1454, 2004.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-CARNELO, S. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications of blastocyst development, cryotolerance, and Messenger RNA expression. **Biol Reprod**, v. 68, p.236-243, 2003.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, v.132, p.365–386, 2000.

RUBESSA, M.; BOCCIA, L.; CAMPANILE, G. LONGOBARDI, V.; ALBARELLA, S.; TATEO, A. et al. Effect of energy source during culture on in vitro embryo development, resistance to cryopreservation and sex ratio. **Theriogenology**, v. 76, p.1347–55, 2011.

SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N. L.; PARRISH, J. J.; MEMILI, E. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 131, p.895–904, 2006.

SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N. L.; PARRISH, J. J.; MEMILI, E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Anim Reprod Science**, v. 101, p.225–40, 2007.

SANTOS, M. A.; KUIJK, E. W.; MACKLON, N. S. The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. **Reprod**, v. 139, p.23–34, 2010.

SEPULVEDA, S.; GARCIA, J.; ARRIAGA, E.; DIAZ, J.; NORIEGA-PORTELLA, L.; NORIEGA-HOCES, L. In vitro development and pregnancy outcomes for human

embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. **Fertil Steril**, v. 91, p. 1765–1770, 2009.

SHARMA, G.; NATH, A.; PRASAD, S.; SINGHAL, S.; SINGH, N.; GADE, N. et al. 2012. Expression and Characterization of Constitutive Heat Shock Protein 70.1 (HSPA-1A) Gene in In Vitro Produced and In Vivo-Derived Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos. **Reprod Domest Anim**, v. , p. , 2012. (doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02002).

SOARES, J. B.; AUGUSTO, G.; RODRIGUES, D. Critérios de seleção embrionária. In: **Tratado de Reprodução Assistida**, São Paulo, Segmento Farma, 2010, p.316-326.

SOTOMARU, Y.; KAMISAKO, T.; HIOKI, K. Estrous stage- and animal age-independent superovulation in the BrIHan:WIST@Jcl (GALAS) Rat. **Exp Anim**, v. 54, p.137–141, 2005.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões**. Savoy IL Press, São Paulo, 1998.

SUMMERS, M. C.; BIGGERS, J. D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. **Hum Reprod Update**, v. 9, p.557–582, 2003.

SUMMERS, M. C.; MCGINNIS, L. K.; LAWITTS, J. A.; BIGGERS, J. D. Mouse embryo development following IVF in media containing either L-glutamine or glycyl-L-glutamine. **Hum Reprod**, v. 20, p. 1364-71, 2005.

TESARIK J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. **Reprod Biomed Online**, v. 10, p. 370-375, 2005.

TONACK, S.; ROLLETSCHEK, A.; WOBUS, A. M.; FISCHER, B.; SANTOS, A. N. Differential expression of glucose transporter isoforms during embryonic stem cell differentiation. **Differentiation**, v. 74, p. 499–509, 2006.

TONACK, S.; RAMIN, N.; GARIMELLA, S.; RAO, R.; SESHAGIRI, P. B.; FISCHER, B. et al. Expression of glucose transporter isoforms and the insulin receptor during hamster preimplantation embryo development. **Ann Anat**, v. 191, p.485–95, 2009.

VAN BLERKOM J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. **Reproduction**, v. 128, p. 269-80, 2004.

VANDA ELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D. G. D.; KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine in vitro produced embryos of different developmental capacity. **Reproduction and Fertility**, Merelbeke, v. 133, n.4, p. 709-718, 2007.

VAN LANGENDONCKT, A.; DEMYLLE, D. WYNS, C. et al. Comparison of G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study. **Fertility and Sterility**, v. 76, p. 1023-1031, 2001.

VERBERG, M. F.; MACKLON, N. S.; NARGUND, G.; FRYDMAN, R.; DEVROEY, P.; BROEKMAN, F. J.; FAUSER, B. C. Mild ovarian stimulation for IVF. **Hum Reprod Update**, v. 15, p.13–29, 2009.

VERLINSKY, Y.; COHEN, J.; MUNNÉ, S. et al. A. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 82, n. 2, p. 302-303, 2004.

WARZYCH, E., PEIPPO, J., SZYDŁOWSKI, M., AND LECHNIAK, D. Supplements to *in vitro* maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. **Anim Reprod Sci**, v. 97, p. 334–343, 2007.(doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2006.01.011).

WATSON, A. J.; NATALE, D. R.; BARCROFT, L. C. Molecular regulation of blastocyst formation. **Anim Reprod Sci**, v. 82/83, p. 583-592, 2004.

WHITE, 1946 apud SUMMERS, M. C.; BIGGERS, J. D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. **Hum Reprod Update**, v. 9, p.557–582, 2003.

WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. **J Assist Reprod Genet**, v. 28, p.3–6, 2011.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v. 1, p.77-83, 2007.

WU, J.; XU, B.; WANG, W. Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on the developmental competence of porcine preantral follicle oocytes grown in vitro. **J Assist Reprod Genet**, v. 24, p.419–424, 2007.

YOUNIS, A.; CLOWER, C.; NELSEN, D.; BUTLER, W.; CARVALHO, A.; HOK, E.; GARELNABI, M. The relationship between pregnancy and oxidative stress markers on patients undergoing ovarian stimulations. **J Assist Reprod Genet**, v. 29, p.1083–1089, 2012.

ZIEBE, S.; BANGSBOLL, S.; SCHMIDT, K. L. T.; LOFT, A.; LINDHARD, A.; NYBOE, A. Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. **Hum Reprod**, v. 19, p.1457–1460, 2004.

## 11.0 APÊNDICE

### 11.1 Artigo submetido para publicação Theriogenology - 2013

#### EFFECT OF SINGLE AND SEQUENTIAL CULTURE SYSTEMS ON DEVELOPMENTAL COMPETENCE AND GENE EXPRESSION IN BOVINE EMBRYOS

*Juliana Polisseni<sup>a,b,c</sup>, M. Sc., Michele Munck Pereira<sup>a</sup>, M. Sc., Martha de Oliveira Guerra<sup>b</sup>, Ph.D., Carolina Campobiango Quintão<sup>a</sup>, M. Sc., Lilian Tamy Iguma<sup>a</sup>, Ph.D, Wanderlei Ferreira de Sá<sup>a</sup>, Ph.D., Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>a</sup>, Ph.D., Vera Maria Peters<sup>b</sup>, Ph.D,*

<sup>a</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36038-330, Brazil.

<sup>b</sup> Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

<sup>c</sup> Corresponding author

**Corresponding author for reprints:** Juliana Polisseni- email: [jupol@powermail.com.br](mailto:jupol@powermail.com.br)

Contact: Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, 36038-330, Brazil.

Telephone number: (55 32) 3311-7436

## Abstract

The objective was to evaluate bovine embryo development and gene expression in embryos cultured in single or in sequential culture systems with media designed for human embryos and to compare these embryos with embryos cultured in CR2aa and SOF media, which is commonly used for bovine embryos. Cumulus-oocyte complexes were matured and fertilized in vitro at 38.8°C, 95% humidified air, and 5% CO<sub>2</sub>. Presumptive zygotes were distributed randomly among the following groups: CR2aa, SOFaa, sequential system (ECM®/Multiblast® - Irvine®) and single system (Global® – LifeGlobal®). Cleavage and blastocyst rates were evaluated, and the differences between groups were analyzed using the Chi-square test. Real-time PCR was used for a gene expression analysis in blastocysts. The gene expression was quantified with REST® using the *Pair-wise Fixed Reallocation Randomization TEST*®. No significant difference ( $P>0.05$ ) was observed in the overall cleavage rate among groups, but there were differences in the distribution of embryos at different developmental stages. A higher ( $P<0.05$ ) overall blastocyst rate was found in a single culture system than in a sequential culture system, although it was similar ( $P>0.05$ ) to that of CR2aa and SOFaa. Differences ( $P<0.05$ ) in expression of *GLUT1* and *GLUT5* were found among embryos cultured in single and sequential systems. Comparisons also showed a difference ( $P<0.05$ ) in gene expression among embryos cultured in single systems and CR2aa (*HSP70.1*, *PRDX1*, *GLUT5*) or SOFaa (*HSP70.1*, *GLUT1*). In conclusion, a single culture system is more appropriate than a sequential one for bovine embryos, achieving similar results to CR2aa and SOFaa media in terms of blastocyst production. There were differences in expression of genes associated with stress and sugar uptake among the groups.

**Keywords:** sequential media, single medium, gene expression, embryo.

## 1. Introduction

While a certain amount of progress has been made for *in vitro* embryo production (IVP) in bovines, blastocyst production rarely achieves rates above 40% (1, 2), with an average of 35% in commercial companies (3). These low rates mainly occur because of inadequate culture conditions, which are known to impair embryo development, causing alterations in gene expression, ultrastructure, compaction and blastulation (4, 5, 6).

Different media were developed in an attempt to increase the success of embryo culture. Synthetic Oviduct Fluid with amino acids (SOFaa) (7) and CR2aa (8) are chemically defined media to which serum and albumin, in different concentrations, can be added (8, 9, 10, 11), and these media are commonly used by commercial companies for bovine embryos. Improvements in culture media can be observed for human embryos, where the concerns with safety and social aspects are generally more evident than in bovine embryos, leading to a continued search for better culture conditions and making several media available.

In embryo culture, there are two views for the ideal composition of media to establish an *in vitro* culture environment for proper embryonic development: a “back to nature” or sequential culture system and a “let the embryo choose” or single culture system (12). According to the “back to nature” approach, the culture system should meet the demands of embryos to simulate their passage from the Fallopian tubes to the uterus; thus, the media compounds differ along the culture period (13, 14). In the “let the embryo choose” approach, all components seen by the embryos during all stages of postfertilization *in vitro* development are present in formulations as a single medium (15). Those views can also be applied to bovine embryos. Earlier, Lane *et al.* (16) demonstrated that G1 and G2 media, a sequential medium commercialized for human embryos, can produce equivalent success rates in bovine embryos compared to a co-culture system. CR2aa and SOFaa media are generally used as a single medium, with no supplementation along the embryo culture period, but those media can also be used in sequential or two-step culture systems. Felmer *et al.* (17), using KSOM and SOF in two-step and in sequential systems, observed a lower rate of blastocysts in a sequential system. In humans, sequential and single culture systems have been used with media designed for their embryos, such as Early Cleavage Medium® (ECM®)/Multiblast® media (Irvine, Santa Ana, USA) and Global® medium (LifeGlobal®, Toronto, CA), respectively. Those media can be used to replace SOFaa and CR2aa media in single or sequential culture systems for bovine embryos, but they need to be validated for this species.

While it is reasonable to use *in vitro* developmental end points, such as blastocyst rate, to evaluate the efficacy of culture systems, it is also necessary to evaluate the effects of the culture systems at a molecular level,

such as the expression of important genes. These observations should be performed because the suboptimal *in vitro* environment can induce epigenetic modifications and alter gene expression in preimplantation stage embryos (4, 18), even if the alterations are not morphologically perceived during the preimplantation stages. Indeed, *in vitro* systems have been shown to affect transcriptional activity in embryos at various stages of development (1, 2) that, in turn, can have serious implications for the normality of the blastocyst.

In this context, evaluation of the expression of genes that are important for embryo development becomes necessary. We chose to evaluate the expression of genes encoding important proteins for embryo development, such as *HSP70.1* (heat shock 70 kD protein 1A), peroxiredoxin 1 (*PRDX1*), and facilitated glucose/fructose transporters (*GLUT1* and *GLUT5*). Expression of *HSP* genes is closely associated with cellular responses to stress caused by inadequate environmental and culture conditions (19), so alterations in the expression of these genes can be indicative of stressful conditions. Peroxiredoxins are important enzymes for cellular defense against oxidative stress (20), and they play a role in cellular redox regulation and antioxidant protection by catalyzing peroxide reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> organic hydroperoxides and peroxynitrite (21). In mammalian embryos, glucose becomes the key energy substrate from the late cleavage stage, and it enters the pre-implantation embryo preferentially by facilitated diffusion mediated by *GLUTs* (22, 23, 24). An abnormal environment and alterations in glucose transport and metabolism at the earliest stages of development can impact fetal development (25).

The aim of the present study was to evaluate the effect of single and sequential culture systems with media designed for human embryos (Global® and ECM®/Multiblast® media, respectively) on the development and gene expression of bovine embryos and to compare those systems with CR2aa and SOFaa media.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Chemicals and reagents*

The chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) unless indicated otherwise.

### *2.2 In vitro embryo production*

#### *2.2.1 Oocyte recovery*

Experimental procedures were approved by the Ethics and Animal Experiments Committee of the Federal University of Juiz de Fora (No. 002/09). Ovaries from crossbred dairy cattle were obtained from a local abattoir (n=290) and were transported at 37°C in a saline solution containing 0.005% streptomycin sulfate.

### *2.2.2 Maturation, fertilization and in vitro culture*

Cumulus oocyte complexes (COCs) (n=1040) were aspirated from follicles with a diameter of 2–8 mm, and those with homogenous cytoplasm and at least three layers of compact cumulus cells were used (26, 27). COCs were matured in vitro in 400 µL TCM 199 medium (Gibco Labs., Grand Island, NY) with 10% inactivated estrous cow serum and 20 µg/mL follicle stimulating hormone (Pluset, Serono, Italy) for 24 h at 38.8°C with 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. After maturation, COCs were fertilized with certified bovine semen obtained by the swim-up method (28). IVF was performed with 15–25 COCs in 100 µL drops of fertilization medium (29) supplemented with 20 µg/mL heparin and 6 mg/mL fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) fraction V. COCs were co-incubated with 2×10<sup>6</sup> spermatozoa/mL for 22 h under the same conditions used for maturation. After fertilization, the presumptive zygotes were partially stripped by mechanical pipetting in TALP-Hepes medium and then randomly distributed into experimental groups. Embryo culture was performed under the same conditions used for maturation.

### *2.3 Experimental groups:*

Presumptive zygotes were randomly distributed into groups cultured in different media as follows:

- CR2aa group: modified CR2aa medium (8) supplemented with 5% BSA and 10% fetal calf serum (FCS; Nutricell, Campinas, SP, Brazil) for the whole culture period, n=276
- SOFa medium (7) supplemented with 5% BSA and 10% FCS for the whole culture period, n=264
  - Sequential culture system (sequential system) group: ECM®/Multiblast® media (Irvine Scientific) until 72 h post insemination in ECM® and then moved to Multiblast® medium supplemented with 5% BSA, n=216
  - Single culture system (single system) group: Global® medium (LifeGlobal®) supplemented with 5% BSA for the whole culture period, n=284

In CR2aa, SOFa and single systems groups, 50% of the medium was renewed until the third day after fertilization as a protocol of that culture system (29) as well as to expose the embryos to a manipulation like the sequential culture system.

### *2.4 Evaluation of embryonic development*

The total cleavage rate and the proportion of cleaved embryos in different cell stages (2-cell, 4–7-cell, and 8–16-cell) were calculated at 72 h post-insemination (hpi). The total blastocyst rate and the proportion of

embryos in different blastocyst stages (early blastocyst, blastocyst, expanded blastocyst and hatched blastocyst) were calculated at 192 hpi.

Evaluation of the embryo stage was performed according to the parameters described in the Manual of the International Embryo Transfer Society (30). All rates were calculated based on the number of presumptive zygotes.

## 2.5 Gene expression

### 2.5.1 RNA extraction and reverse transcription

Primers for *HSP70.1* and  $\beta$ -*actin* were designed based on sequences available in the GenBank database (31) using the Primer3 program (32). Primers for *PRDX1*, *GLUT1* and *GLUT5* have been described elsewhere (33, 5, 18, respectively). All primers were synthesized by Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) and are described in Table 1.

Total RNA was extracted from three pools of 10 blastocysts per group (5, 6, 10, 19, 34, 35) using an RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and then treated with DNase. RNA samples were reverse transcribed using a SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, Carlsbad, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. Quantification and purity determination of the cDNA from each pool per group were performed using a 1  $\mu$ L sample in a spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE, USA). The average values were 592.87 ng/  $\mu$ L, 586.03 ng/  $\mu$ L, 561.73 ng/  $\mu$ L, 609.70 ng/  $\mu$ L, with 260/280 ratio of 1.57, 1.59, 1.52, 1.56, respectively, for CR2aa, SOF, single medium and sequential media.

### 2.5.2 Relative quantification by real-time PCR

Relative quantification was performed in triplicate using real-time PCR (ABI Prism 7300 Sequence Detection System; Applied Biosystems, Foster City, CA). The reactions were prepared using a SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with primers, nuclease-free water and cDNA. The amount of cDNA used in the reactions ranged according to the optimal concentration identified in preliminary experiments for each transcript analyzed. The PCR conditions were 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 95°C for 15 s, the primer annealing temperature (Table 1) for 30 s and 60°C for 30 s. After each PCR run, a melting curve analysis was performed to confirm that a single specific product was generated. Negative controls, comprising the PCR reaction mixture without nucleic acids, were also run with each group of samples.  $\beta$ -*actin* was used as an endogenous control (36) and presented a coefficient of variation of threshold cycle of 3.43% among samples.

Primer efficiency was calculated using LinRegPCR software (37). Relative abundance analyses were performed using REST software (38) and were based on primer efficiency.

### *2.6 Statistical analyses*

The cleavage and blastocyst rates and the proportion of embryos at different cell stages were analyzed using the chi-square test. Relative gene expression analyses were performed by REST software (38) using a pairwise fixed reallocation randomization test. Gene expression values are shown as the mean $\pm$ s.e.m. Differences were considered significant at  $P<0.05$ .

## **3. Results**

### *3.1 Developmental competence of in vitro embryos*

Different capacities to support embryo development were found for each group evaluated. Despite the fact that no significant difference ( $P>0.05$ ) was observed in the total cleavage rate among the groups (Table 2), there was a difference in the distribution of embryo stages among groups. At 72 hpi, more embryos ( $P<0.05$ ) reached the 8-16 cell stage when cultured in SOFaa than when cultured in the CR2aa and sequential systems, but the rate was similar ( $P>0.05$ ) to that of the single system. Embryos cultured in the CR2aa, single and sequential systems had similar ( $P>0.05$ ) development rates toward the 8-16 stage (Table 2). No difference was observed among groups in other cell stages at 72 hpi.

When development to the blastocyst stage was evaluated, a lower ( $P<0.05$ ) overall rate was found in the sequential system than in the SOFaa and single systems (Table 3). No difference ( $P>0.05$ ) among CR2aa, SOFaa and the single system was found for the overall blastocysts rate, but SOFaa and the single system had more blastocysts at an expanded stage than did CR2aa and the sequential system. The lowest ( $P<0.05$ ) expanded blastocyst rate was found in the sequential system (Table 3).

### *3.2 Gene expression*

Differences in the expression of genes encoding proteins that are important for the cellular responses to stress and embryo metabolism were found among embryos cultured in different media. Embryos cultured in sequential or single systems showed lower relative expression ( $P<0.05$ ) of *HSP70.1*, *PRDX1* and *GLUT5* compared to embryos cultured in CR2aa (Fig. 1B and 1C, respectively). Lower *HSP70.1* expression ( $P<0.05$ )

was found in embryos in the sequential and single system than in SOFaa (Fig. 1D and 1E, respectively), whereas *GLUT1* expression was higher in the single system (Fig. 1D), and *GLUT5* expression was lower in the sequential system (Fig. 1E). The comparisons between single and sequential systems showed lower ( $P<0.05$ ) expression of genes associated with metabolism (*GLUT1* and *GLUT5*) in the sequential system group (Fig. 1F), but no difference ( $P>0.05$ ) was found in the expression of genes associated with cellular stress (*HSP70.1* and *PRDX1*). Furthermore, no difference in gene expression was found between the SOFaa and CR2aa groups ( $P>0.05$ ) (Fig. 1A).

#### 4. Discussion

The *in vitro* culture environment is crucial for the success of IVP programs, and efforts have been made to achieve better embryo culture conditions. Although several studies have evaluated different *in vitro* culture systems (2, 16, 39, 40, 41), there is no consensus concerning an optimized medium that fulfills embryo requirements during pre-implantation development. In the present study, we evaluated two different culture systems (single and sequential) with commercial media designed for human embryos for the development of *in vitro*-fertilized bovine embryos. Our aim was to develop better culture conditions than those provided by CR2aa and SOFaa media, which are commonly used for bovine embryos. Our data suggested that a single culture system with Global® medium can support bovine embryo development until the blastocyst stage at rates similar to those obtained using CR2aa and SOFaa but with differences in gene expression in embryos at the blastocyst stage.

Single and sequential systems resulted in similar overall cleavage rates that were also similar to those of CR2aa and SOFaa media but with different proportions of embryos at the 8–16 cell stage at 72 hpi. SOFaa medium had a higher rate of embryos at the 8–16 cell stage, comparable only to the single system, indicating that the medium can hasten earlier cleavages, which, in turn, can impact further development. Earlier studies showed an association between accelerated early development and competence to develop to the blastocyst stage (14, 41, 42). Indeed, our study showed that, although there is no difference in overall blastocyst production among CR2aa, SOFaa and the single system, a higher rate of blastocyst production at more advanced stages (i.e., expanded blastocysts) was observed in embryos cultured in SOFaa or in single medium but not in CR2aa. Thus, it is possible that the higher rate of embryo production at an expanded stage in SOFaa and the single system was due to more accelerated development at earlier stages.

The lower overall blastocyst and expanded blastocyst rates in sequential systems compared to single systems is in agreement with previous studies with human embryos, which reported a greater proportion of zygotes developing toward expanded and hatched blastocysts in single systems compared to sequential systems (15, 41). Embryos in sequential systems also showed less development to expanded blastocysts than that observed in CR2aa and SOFaa media. In the present study, CR2aa and SOFaa were supplemented with serum and BSA in the beginning of the culture period, but no supplementation was added during the embryo culture period, similar to single medium, where only Global® medium with BSA was used for the whole culture period. Thus, one similar feature among CR2aa, SOFaa and single medium was the use of a continuous culture until the blastocyst stage without any other interference, which is in contrast to sequential media in which embryos cultured initially in ECM® were moved to Multiblast® medium supplemented with 5% BSA at 72 hpi. One reason for the low overall blastocyst and expanded blastocyst rates in sequential media may be microfluctuations in temperature and pH and, consequently, an increased risk of embryonic stress. In addition, when moving the embryos to other culture media, as in the sequential systems, putative autocrine and paracrine factors already secreted by the embryos may be left behind, resulting in a sudden shift of the microenvironment (15). Thus, a possible advantage of single systems is the fact that they keep the culture environment as stable as possible.

Epigenetic modifications occur during the pre-implantation period and can be influenced by the in vitro culture environment (43, 44) and can alter the expression of important genes for embryo and fetus development. Several studies have demonstrated the effect of in vitro culture on gene expression (11, 14, 18, 19, 34, 45). In the present study, we also aimed to determine if the culture systems could have an impact on gene expression compared to CR2aa and SOFaa. The genes analyzed participate in important processes during embryo development, such as glucose and fructose transportation (*GLUT1* and *GLUT5*) and protection against heat and oxidative stress (*HSP70.1* and *PRDX1*).

In mammalian embryos, sugars become the key energy substrate from the late cleavage stages onward, and their entrance into the preimplantation embryo is preferentially by facilitated diffusion mediated by *GLUTs* (23, 25, 46, 47). *GLUT1* is a ubiquitous isoform that facilitates glucose uptake by embryonic cells, whereas *GLUT5* facilitates fructose uptake (45). The present study showed that the expression of genes associated with sugar transport differs according to the environment in which the embryos were cultured. An abundance of *GLUT1* transcripts was higher in embryos cultured in single medium than in embryos cultured in SOFaa and the sequential system, whereas the abundance of *GLUT5* transcripts was higher in embryos cultured in CR2aa, SOFaa and the single system than in embryos cultured in the sequential system. Those data indicate that the

ability of an embryo to uptake different energy substrates can be modulated by the in vitro environment. Interestingly, every comparison between the single or sequential system and CR2aa or SOFaa showed differences in the expression of *GLUT1* and/or *GLUT5*, but when CR2aa and SOFaa were compared, no difference for these two genes was found. One possible explanation is that the presence of glucose in the media of single (Global® medium) and sequential (ECM® and Multiblast® media) systems, in contrast to CR2aa and SOFaa, influences the expression of sugar transporters. A study with human patients showed that expression of *GLUTs* in leucocytes is decreased in patients with diabetes (48), suggesting that high glucose levels may decrease the expression of sugar transporter genes. Nevertheless, as the expression levels of *GLUT1* and *GLUT5* were also different between single and sequential systems, which both contained glucose, we cannot associate the expression of *GLUTs* with the presence of sugars in embryo culture media. The effect of culture media and their components on the expression of glucose transports deserves further investigation.

In vitro culture has been associated with the production of reactive oxygen species, resulting in oxidative stress on the embryos (34). The *HSP* and *PRDX* proteins play an important role against oxidative stress (19, 49, 50), and their expression by the embryos is suggestive of stressful conditions. *PRDX1* was shown to be important for cell defense against oxidative stress (51), and the expression of *HSP70.1* is associated with several types of stress (52), such as heat and oxidative stress (53). Expression levels of *HSP70.1* and *PRDX1* genes in blastocysts also differed among the groups evaluated. A lower abundance of *HSP70.1* transcripts was found in blastocysts cultured in single and sequential systems than in blastocysts cultured in CR2aa and SOFaa media, whereas the abundance of *PRDX1* was lower in single and sequential systems than in CR2aa only. These differences may be due to the presence of antioxidative components in the media of single and sequential systems compared to CR2aa and SOFaa media. EDTA is present in the composition of Global® medium and ECM®/Multiblast® media, and it is known to have an antioxidative role in embryo culture (54), which may have contributed to protecting the embryos against ROS, thus reducing the expression of *HSP70.1* and *PRDX1* genes.

Another component in the media that may have influenced the expression of genes associated with stress is serum. CR2aa and SOFaa were supplemented with 10% FCS, whereas Global® medium and ECM®/Multiblast® media were FCS-free. Serum is known to have embryotrophic and embryotoxic factors (55). Although serum may stimulate the production of blastocysts (56, 57), it may also disturb gene expression (58). Despite the fact that Oliveira *et al.* (59) did not find a difference in *HSP70.1* expression between blastocysts cultured in different concentrations of estrus cow serum, Rizos *et al.* (57) observed an increased expression of genes encoding proteins associated with protection against oxidative stress, such as *MnSOD* and *SOX*, in embryos cultured with

serum. Therefore, another explanation for the difference in expression of *HSP70.1* and *PRDX1* may be the presence of FCS in CR2aa and SOFaa media. Interestingly, no difference in expression of those genes was found when comparisons were performed between media with FCS (CR2aa vs SOFaa) or without FCS (Global® medium vs ECM®/Multiblast® media), reinforcing the idea of a possible effect of serum on the expression of those genes. However, we cannot discard the possibility that other components in the media may also be involved in the expression of those genes.

Although some differences in gene expression were observed among the blastocysts produced in different groups, no effect of CR2aa, SOFaa and the single system on the overall blastocyst production rate was found, suggesting that the embryos were able to develop in those conditions. This ability is likely due to the embryo plasticity, allowing the embryo to adapt to the environment, which includes modifications of gene expression patterns. Thus, even embryos with similar developmental rates can display different gene expression patterns according to the media in which they were cultured. However, it is not clear if such differences in gene expression are the result of epigenetic modifications that may be implicated in further disturbances during pregnancy and after birth. Despite the fact that bovine embryos produced in vitro generally result in normal development, embryo losses and developmental defects can be found at higher rates than in embryos conceived naturally, and alterations in gene expression patterns are a potential mechanism associated with such abnormalities (60). In humans, there is also a concern that suboptimal in vitro culture conditions may be implicated in epigenetic modifications that can affect further development (61, 62). Thus, the search for better culture conditions for bovine embryos must be continued, including evaluations not only of embryo production but also of cellular and molecular aspects.

In summary, the single culture system with Global® medium is more appropriate for bovine embryos than is the sequential culture system with ECM®/Multiblast® media, achieving blastocyst production results similar to those obtained using CR2aa and SOFaa media. However, differences in the expression of genes associated with stress and sugar uptake were observed. These differences in gene expression are not necessarily associated with blastocyst production, but they indicate that molecular alterations may be present in the embryos. The meaning of such differences for further development remains to be elucidated.

#### **Conflict of interests**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Acknowledgments

This study was funded by the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (APQ-01749-08). We thank Cassiana Monteiro Boya for assistance with preparing the manuscript, and Luiz Cláudio Ribeiro for the statistical analysis.

### References

- 1 - Niemann H, Wrenzycki C .Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 2000;53:21–34.
- 2 - Rizos D, Pintado B, De La Fluente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A .Development and pattern of mRNA relative abundance of bovine embryos cultured in the isolated mouse oviduct in organ culture. *Mol Reprod Dev* 2007;74:716–23.
- 3 - Viana JHM, Siqueira LGB, Palhao MP, Camargo LSA .Features and Perspectives of the Brazilian In Vitro Embryo Industry. *Anim Reprod* 2012;9: 12-18.
- 4 - Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* 2007;1:77-83.
- 5 – Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E .Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim Reprod Science* 2007;101:225–40.
- 6 - Palasz AT, Beltran BP, Martinez MF, Perez-Garnelo SS, Ramirez MA .Development, molecular composition and freeze tolerance of bovine embryos cultured in TCM-199 supplemented with hyaluronan. *Zygote* 2008;16:39–47.
- 7 - Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. .High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. *Theriogenology* 1999;52(4):683-700.
- 8 - Camargo LSA, Boite MC, Wohlres-Viana S, Mota GB, Serapiao RV, As WF, Viana JHM, Nogueira LAG. Osmotic challenge and expression of Aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. *Cryobiology* 2011;63:256-262.
- 9 - Abe H, Hoshi H Evaluation of bovine embryos produced in high performance derum-free media. *Journal of Reprod and Development* 2003;49:193-202.

- 10 - Lim KT, Jang G, Ko KH, Lee WW, Park HJ, Kim JJ, Lee SH, Hwang WS, Lee BC, Kang SK .Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media Theriogenology 2007;67:293-302.
- 11 - Pereira MM, Machado MA, Costa FQ, Serapião RV, Viana JH, Camargo LS. Effect of oxygen tension and serum during ivm on developmental competence of bovine oocytes. Reprod fertil dev 2010;22:1074–82.
- 12 - Summers MC, Biggers JD .Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. Hum Reprod Update 2003;9:557–582.
- 13 - Hambiliki F, Sandell P, Yaldir F, Stavreus-Evers A .A prospective randomized sibling-oocyte study of two media systems for culturing cleavage-stage embryos - impact on fertilization rate. J Assist Reprod Genet 2011;28:335–341.
- 14 - Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahcci M .Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media - a sibling oocyte study. J Assist Reprod Genet 2012;29:891–900.
- 15 - Reed ML, Hamic MA, Thompson DJ, Caperton CL .Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study. Fertil Steril 2009;92:1783–86.
- 16 - Lane M, Gardner DK, Hasler MJ, Hasler JF .Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. Theriogenology 2003;60:407–19.
- 17 - Felmer RN, Arias ME, Muñoz GA, Rio JH .Effect of different sequential and two-step culture systems on the development, quality, and RNA expression profile of bovine blastocysts produced in vitro. Mol Reprod Dev 2011;78(6):403-14.
- 18 - Camargo LSA, Powell AM, Vale Filho VR, Wall RJ .Comparison of gene expression in individual preimplantation bovine embryos produced by in vitro fertilisation or somatic cell nuclear transfer. Reprod Fertil Dev 2005;17:487–96.
- 19 - Oliveira ATD, Lopes RFF, Rodrigues JL .Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro under varying embryo density conditions. Theriogenology 2005;64:1559–72.
- 20 - Immenschuh S, Baumgart-Vogt E .Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation. Antioxid Redox Signal 2005;7:786-777.
- 21 – Neumann CA, Cao J, Manevich Y .Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. Cell Cycle 2009;15:4072-4078.

- 22 – Khurana NK, Niemann H .Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. *Theriogenology* 2000;54: 313–26.
- 23 - Tonack S, Rolletschek A, Wobus AM, Fischer B, Santos AN .Differential expression of glucose transporter isoforms during embryonic stem cell differentiation. *Differentiation* 2006;74: 499–509.
- 24 - Tonack S, Ramin N, Garimella S, Rao R, Seshagiri PB, Fischer B et al Expression of glucose transporter isoforms and the insulin receptor during hamster preimplantation embryo development. *Ann Anat* 2009;191:485–95.
- 25 - Purcell SH, Moley KH .Glucose transporters in gametes and preimplantation embryos. *Cell press* 2009;20:483–89.
- 26 - Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G .Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod* 1983;28:235–247.
- 27 - Hawk HW, Wall RJ .Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 1994;41:1571–83.
- 28 - Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML et al .Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986;25:591–600.
- 29 - Polisseni J, Sá WF, Guerra MO, Machado MA, Serapião RV, Carvalho BC et al .Post-biopsy bovine embryo viability and whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 2010;93:783–88.
- 30 - Stringfellow DA, Seidel SM .Manual da sociedade internacional de transferência de embriões. Savoy IL Press, São Paulo; 1998.
- 31 - GenBank database (2010) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed June 18 2010.
- 32 - Rozen S, Skaletsky H .Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 2000;132:365–86.
- 33 - Mourot M, Dufort I, Gravel C, Algriany O, Dieleman S, Sirard MA .The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Mol Reprod Dev* 2006;73:1367–79.

- 34 - Balasubramanian S, Son WJ, Mohana BK, Ock SA, Yoo JG, Im GS et al .Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. *Theriogenology* 2007;68:265–275.
- 35 - Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E .Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 2006;131:895–904.
- 36 - Bettegowda A, Patel OV, Ireland JJ, Smith GW .Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, Cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2a during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. *Mol Reprod Dev* 2006;73:267–278.
- 37 - Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF .Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 2003;339:62–66.
- 38 - Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L .Relative expression software tool (REST<sup>®</sup>) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 2002;30:26–36.
- 39 - Biggers JD .Thoughts on embryo culture conditions. *RBM on line* 2001;4:30–38.
- 40 - Rezk Y, Huff C, Rizk B .Effect of glutamine on preimplantation mouse embryo development in vitro. *A J Obst Gyn* 2004;190:1450–54.
- 41 - Sepulveda S, Garcia J, Arriaga E, Diaz J, Noriega-Portella L, Noriega-Hoces L .In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fertil Steril* 2009;91:1765–70.
- 42 - Ben-Yosef D, Amit A, Azem F, Schwartz T, Cohen T, Mei-Raz N, Carmon A, Lessing JB, Yaron Y .Prospective Randomized Comparison of two embryo culture systems: P1 Medium by Irvine Scientific and Cook IVF Medium. *J Assist Reprod Genet* 2004;21:291–295.
- 43- Le Bouc Y, Rossignol S, Azzi S, Steunou V, Netchine I, Gicquel C .Epigenetics, genomic imprinting and assisted reproductive technology. *Ann Endocrinol*. 2010;71(3):237-8.
- 44 - Velker BA, Denomme MM, Mann MR .Embryo culture and epigenetics. *Methods Mol Biol*. 2012;912:399–421.
- 45 - Bertolini N, Beam SW, Shim H, Bertolini LR, Moyer AL, Famula TR et al .Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 2002;63:318–328.

- 46 - Barceló-Fimbres M, Seidel GE Jr .Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. Mol Reprod Dev 2007;74 (11):1406–1418.
- 47 - Rubessa M, Boccia L, Campanile G, Longobardi V, Albarella S, Tateo A, et al .Effect of energy source during culture on in vitro embryo development, resistance to cryopreservation and sex ratio. Theriogenology 2011;76:1347–55.
- 48 - Kipmen-Korgun D, Bilmen-Sarikcioglu S, Altunbas H, Demir R, Korgun ET .Type-2 diabetes down-regulates glucose transporter proteins and genes of the human blood leukocytes. Scand J Clin Lab Invest 2009;69(3):350-8.
- 49 - Feugang JM, Camargo-Rodríguez O, Memili E .Culture systems for bovine embryos. Livestock Science 2009;121:141–9.
- 50 - Sharma G, Nath A, Prasad S, Singhal S, Singh N, Gade N et al .Expression and Characterization of Constitutive Heat Shock Protein 70.1 (HSPA-1A) Gene in In Vitro Produced and In Vivo-Derived Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos. Reprod Domest Anim 2012. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02002.
- 51 - Rani V, Neumann CA, Shao C, Tischfield JA. Prdx1 deficiency in mice promotes tissue specific loss of heterozygosity mediated by deficiency in DNA repair and increased oxidative stress. Mutat Res. 2012;735(1-2):39-45.
- 52 - Lee JS, Seo JS .Differential expression of two stress-inducible hsp70 genes by various stressors. Exp Mol Med. 2002;34(2):131-6.
- 53 - Luft JC, Dix DJ .Hsp70 expression and function during embryogenesis. Cell Stress Chaperones 1999;4(3):162-70.
- 54 - Orsi NM, Leese HJ .Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. Mol Reprod Dev. 2001;59(1):44-53.
- 55 - Bavister BD .Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. Hum Reprod Update 1995;1:91:148.
- 56 - Camargo LSA, Sá WF, Ferreira AM, Viana JHM, Araújo, MCC .Taurina no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados in vitro. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 2002;54:396-404.
- 57 - Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Carnelo S. et al .Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications of blastocyst development, cryotolerance, and Messenger RNA expression. Biol Reprod 2003;68:236-243.

58 - Purpera MN, Giraldo AM, Ballard CB, Hylan D, Godke RA, Bondioli KR .Effects of culture medium and protein supplementation on mRNA expression of in vitro produced bovine embryos. Mol Reprod Dev 2009;76:783-793.

59 - Oliveira ATD, Lopes RFF, Rodrigues JL .Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro wth different serum concentrations. Reproduction in dosmetic Animals 2006;41(2):129-136.

60 - Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE .Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. Theriogenology. 2006;65(1):178-91.

61 - Jacob S, Moley KH .Gametes and embryo epigenetic reprogramming affect developmental outcome: implication for assisted reproductive technologies. Pediatr Res. 2005;58(3):437-46.

62 - El Hajj N, Haaf T .Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. Fertil Steril 2013. 1:10 doi:0015-0282.

## Tables

**Table 1.** Primer sequences used for relative gene expression analysis by real-time PCR.

Gene	Primer sequences (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)	GenBank accession no. or reference
<i>PRDX1</i>	Forward: ATGCCAGATGGTCAGTTCAAG Reverse: CCTTGTTCCTGGGTGTGTTG	53	224	33
<i>HSP70.1</i>	Forward: AACAAAGATCACCATCACCAACG Reverse: TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG	59	275	NM174550
<i>GLUT1</i>	Forward: CCAAGGATCTCTCAGAGCACAG Reverse: TTCTTCTGGACATCACTGCTGG	53	110	5
<i>GLUT5</i>	Forward: CATGGTGGCGGGTACTGTT Reverse: CGCAAAAATGACGAAGCTGTAAG	53	103	18
<i>β-actin</i>	Forward: GACATCCGCAAGGACCTCTA Reverse: ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	53	205	NM_17397 23

**Table 2.** Distribution of embryo stages at 72 h post insemination according to different embryo culture groups.

Groups	N	Cleavage			
		Overall	2-cell	4–7-cell	8–16-cell
CR2aa	276	72.1%	10.1%	49.2%	40.7% <sup>(b)</sup>
		(199)	(20)	(98)	(81)
SOFaa	264	75.7%	5.0%	39.5%	55.5% <sup>(a)</sup>
		(200)	(10)	(79)	(111)
Single system	285	74.0%	7.6%	46.4%	46.0% <sup>(ab)</sup>
		(211)	(16)	(98)	(97)
Sequential system	216	75.9%	12.8%	42.7%	44.5% <sup>(b)</sup>
		(164)	(21)	(70)	(73)

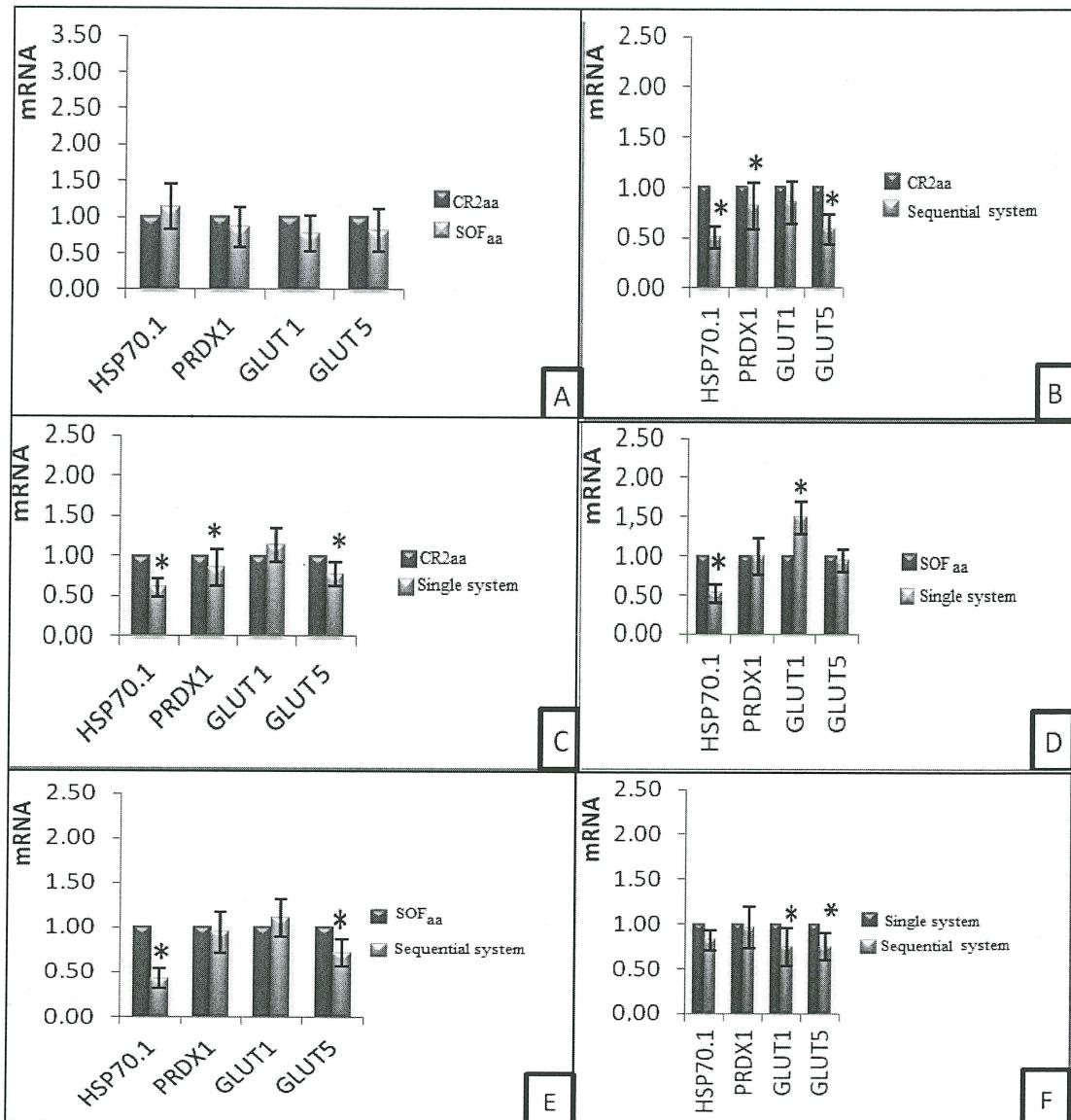
Note: Chi-square test. Different letters at the same stage of development show significant difference among treatments ( $P<0.05$ ).

**Table 3.** Distribution of blastocyst stages at 192 h post insemination according to different embryo culture groups.

Groups	N	Blastocyst				
		Overall	EB	BL	ExB	HB
CR2aa	276	30.4% <sup>(ab)</sup> (84)	20.2% (17)	29.8% (25)	45.2% <sup>(b)</sup> (38)	4.8% (4)
SOFaa	264	37.1% <sup>(a)</sup> (98)	15.3% (15)	24.5% (24)	52.0% <sup>(a)</sup> (51)	8.2% (8)
Single system	285	34.7% <sup>(a)</sup> (99)	12.1% (12)	24.2% (24)	58.6% <sup>(a)</sup> (58)	5.1% (5)
Sequential system	216	26.9% <sup>(b)</sup> (58)	25.9% (15)	43.1% (25)	27.6% <sup>(c)</sup> (16)	3.4% (2)

Note: Chi-square test. Different letters at the same stage of blastocyst show significant difference among treatments ( $P<0.05$ ).

EB: early blastocyst, BL: blastocyst, ExB: expanded blastocyst, HB: hatched blastocyst



**Figure 1.** Comparisons of relative abundance of transcripts in embryos cultured in SOF<sub>aa</sub>, CR2aa, single and sequential systems (A): CR2aa vs SOF<sub>aa</sub> (B): CR2aa vs sequential system, (C): CR2aa vs single system, (D): SOF<sub>aa</sub> vs single system, (E): SOF<sub>aa</sub> vs sequential system, (F): Single system vs sequential system. Columns with (\*) for the same gene differ between treatments ( $P < .05$ ).

**11.2 Artigo submetido para publicação no Jornal Brasileiro Reprodução Assistida - 2013**

**EVALUATION OF SINGLE AND SEQUENTIAL MEDIA CULTURE SYSTEMS IN TWO EXPERIMENTAL MODELS: BOVINE AND RAT**

**Avaliação dos sistemas de cultivo único e sequencial em dois modelos experimentais: bovino e rato**

Juliana Polisseni<sup>a,b,c</sup>, Martha de Oliveira Guerra<sup>b</sup>, João Gabriel Viana de Grázia<sup>b</sup>, Wanderlei Ferreira de Sá<sup>a</sup>, Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>a</sup>, Larissa Cabral Milen<sup>b</sup>, Vera Maria Peters<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Brazilian Agricultural Research Company, Dairy Cattle, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup>Centre for Biology Reproduction, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup>Assisted Reproduction Clinic Pró-Criar/Monte Sinai, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

**Institution where the work was performed:** Centre for Biology Reproduction, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil and Embrapa Dairy Catlle

**Assistance received in the form of funding:** This study was funded by the FAPEMIG - Research Support Foundation of the State of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (26/ and 31/2011).

**Corresponding author:** Juliana Polisseni

Vicente Beguelli n 315, Dom Bosco, Juiz de Fora, Minas Gerais 36025-550, Brazil

e-mail: jupol@powermail.com.br, Tel: +55 (32) 8865-4447, fax: +55 (32) 3232-1315

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar o desenvolvimento embrionário de blastocistos cultivados em sistema de cultivo único e sequencial utilizando embriões bovinos e de rato como modelos experimentais.

**Métodos:** Para bovinos: 840 complexos címulos-ovócitos foram obtidos de ovários, e, em seguida, maturados e fertilizados in vitro. Zigotos foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos para cultivo: Charles Rosenkrans 2 (CR2aa) ( $n = 235$ ), sistema seqüencial (G1/G2) ( $n = 228$ ), sistema seqüencial (ECM/Multiblast) ( $n = 233$ ) e sistema único (Global) ( $n = 165$ ). No terceiro dia após a inseminação a taxa de clivagem foi avaliada e embriões 8-16 células de todos os grupos foram biopsiados e retornados ao cultivo no sistema “well on the well”. A taxa de blastocisto foi avaliada 192 horas após a fertilização. Para o modelo experimental rato: ratas Wistar ( $n = 18$ ) foram superovuladas com PMSG seguido de hCG. Os embriões foram coletados 48 horas após a administração de hCG. Os embriões foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos para cultivo: KSOM ( $n = 96$ ), sistema seqüencial (ECM/Multiblast) ( $n = 233$ ) e sistema único (Global) ( $n = 149$ ). A taxa de blastocisto foi avaliada. Diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste do qui-quadrado. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

**Resultados:** Taxas de blastocisto e clivagem foram semelhantes em sistema de cultivo único e sequencial para embriões bovinos biopsiados. Contudo a taxa de blastocisto foi menor para os meios sequenciais e a taxa de blastocisto expandido foi maior em meio único, comparando com o meio seqüencial ( $P < 0,001$ ), no modelo de rato.

**Conclusões:** O cultivo de embriões em meio único foi similar ao meio seqüencial em embriões bovinos de 8-16 células biopsiados. No entanto o meio único apresentou resultados mais satisfatórios do que o meio seqüencial em embriões de ratos intactos. A diferença da qualidade dos sistemas de cultivo somente é observada quando não se faz nenhum tipo de seleção embrionária.

Palavras-chave: Sistema de cultivo, meio unico, meio seqüencial.

## Abstract

**Objective:** To evaluate the embryonic development of blastocysts cultured in single medium or sequential media systems using bovine and rat embryos as models.

**Methods:** For bovine: a total of 840 cumulus oocyte complexes were obtained from ovaries, and then matured and fertilized in vitro. Zygotes were semi-denuded and distributed randomly among groups for culture: Charles Rosenkrans 2 (CR2aa) (n= 235), sequential media (G1/G2) (n= 228), sequential media (early cleavage medium/Multiblast; n= 233) and single medium (Global medium; n= 165). On the third day after insemination, cleavage rate were evaluated and 8-16 cells embryos for all groups were biopsied and returned for culture in "well on the well system". Blastocyst rate was evaluated 192 hours after fertilization. For rat model female Wistar rats (n=18) were superovulated with injection of PMSG followed by hCG 48 hours later. Embryos were collected 48 hours after hCG administration. The embryos were distributed randomly among groups for culture: KSOM (n= 96), sequential media (early cleavage medium/Multiblast; n= 233) and single medium (Global medium; n= 149). The blastocyst rate was analyzed. Statistical differences among groups were analyzed using the Chi square test. A value of  $P<0.05$  was considered significant.

**Results:** Cleavage and blastocyst rate were similar in single culture and sequential culture in biopsied bovine embryo. However blastocyst rate was lowest in sequential media and expanded blastocyst was higher in single medium compared with that in sequential media ( $P<0.001$ ) in rat model.

**Conclusions:** Embryo culture in single medium was similar sequential media in biopsied 8-16 cells bovine embryos. However single medium was optimal compared with sequential media in intact rat embryos. The difference in the quality of culture systems was observed only when any kind of embryo selection was done.

**Keywords:** Culture system, single medium, sequential media.

## Introduction

Since the first in vitro fertilization (IVF) baby was born in 1978, there has been extensive use of human assisted reproductive technology (ART) (Blake et al., 2002). The success rates of ART are influenced by a multitude of factors (Sifer et al., 2009), and one of the most important steps during ART is maintenance of optimal embryo viability during in vitro culture (Gerber et al. 2012). Incidences of stillbirths and neonatal deaths are mainly due to the use of inadequate culture conditions that impair embryonic development and cause alterations in gene expression, ultrastructure, compaction, and blastulation of embryos (Hentemann & Bertheussen, 2009, Ciray et al., 2012). Therefore, clinicians and researchers have continued to search for optimal embryo culture media, which has led to significant changes in the composition of such media (Sifer et al., 2009).

Different strategies have been developed to increase success in the mammalian embryo culture. Currently, there are numerous commercial culture media available to human embryos, whether they are sequential, that support the different needs of the embryo according to their stage of development or so-called single medium, which all the components necessary for embryonic development already be available since the beginning of development (Lane et al. 2003). Among the few comparative studies that have evaluated the potential of these approaches, their strategies differed significantly in terms of the randomization of groups and the order and brands of culture media (Ciray et al., 2012). Thus, the ability of different media to support the fertilization and culture of preimplantation embryos up to the cleavage stage remains uncertain (Hambiliki et al., 2011; Gerber et al., 2012).

In addition the difficulties to use human embryos on scientific research was a problem in studies that use a small number embryos and using mostly good quality and cell number embryos and this is rarely representative of real case conditions. In our study, we used two experimental model bovine and rat embryo for human due to the ethical and practical limitations of working with human embryos and due to the similarities with human embryos. Bovine are normally monovulators and their embryos are about the same diameter as that of human embryos and have a similar pattern of energy metabolism, measured as oxygen, pyruvate and glucose consumption and lactate production. Approximately the same proportion of in vitro-produced bovine zygotes reach the blastocyst stage in vitro as that in humans, and major zygotic genome activation is initiated at closely related stages (Baumann et al., 2007; Krisher, 2012). Rodents are traditionally used as experimental models for greater availability, easy handling, shorter gestation, and especially for having metabolic homology, ie, greater similarity in the application of substrates with the human embryo (Baumann et al., 2007). In contrast, activation of the embryonic genome in rodents occurs around two cells (Fiorenza et al., 2004), unlike humans, around eight cells.

To establish an ideal culture medium and increase the success rate of ART, a study linking two experimental models to evaluate embryonic development would be required to properly evaluate embryo culture systems. The aim of the present study was to evaluate the development in IVF biopsied bovine and rat embryos as a model, which were cultured in sequential media (early cleavage medium (ECM)/Multiblast and G1/G2) and a single medium (Global medium). The results were compared with those obtained with chemically defined media in which serum and albumin must be added, namely Charles Rosenkrans 2 (CR2aa) for bovine (Camargo et al. 2011) and KSOM (Erbach et al., 1994), which are commonly used for rat embryo culture.

## Materials and methods

### Chemicals

The chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), unless indicated otherwise.

#### *For bovine embryos*

##### Oocyte recovery

Experimental procedures were approved by the Ethics and Animal Experiments Committee of the Federal University of Juiz de Fora (No. 002/09). Ovaries from dairy cattle were obtained from a local abattoir (n=201) and were transported at 37°C in a saline solution containing 0.005% streptomycin sulfate.

##### Maturation, fertilization and in vitro culture

Cumulus oocyte complexes (COCs) (n=861) were aspirated from follicles with a diameter of 2–8 mm, and those with homogenous cytoplasm and at least three layers of compact cumulus cells were used (Bavister et al., 1983; Hawk & Wall 1994). COCs were in vitro matured in 400 µL TCM 199 medium (Gibco Labs., Grand Island, NY) with 10% inactivated estrous cow serum and 20 µg/mL follicle stimulating hormone (Pluset, Serono, Italy) for 24 h at 38.8°C with 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. After maturation, COCs were fertilized with certified bovine semen obtained by the swim-up method (Parrish et al., 1986). IVF was performed with 15–25 COCs in 100 µL drops of fertilization medium (Polisseni et al., 2010) supplemented with 20 µg/mL heparin and 6 mg/mL fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) fraction V. COCs were co-incubated with 2×10<sup>6</sup> spermatozoa/mL for 22 h under the same conditions as those for maturation. After fertilization, the presumptive zygotes were partially stripped by mechanical pipetting in TALP-Hepes medium and then randomly distributed into experimental groups. Embryo culture was performed under the same conditions as those for maturation.

##### Experimental groups:

Presumptive zygotes were randomly distributed into groups cultured in different media as follows:

- CR2aa group: CR2aa medium supplemented with 5% BSA and 10% fetal calf serum (FCS; Nutricell, Campinas, SP, Brazil), n=235
- Sequential media group: G1/G2 (Vitrolife) until the third day after fertilization in G1 and then eight-cell blastocysts cultured in G2 with 5% BSA, n=228
- Sequential media group: ECM/Multiblast (Irvine) until the third day after fertilization in ECM and then eight-cell blastocysts cultured in Multiblast supplemented with 5% BSA, n=233
- Single medium group: Global medium (Global Life) supplemented with 5% BSA, n=165  
For all groups, on the third day after fertilization, cleavage rate was evaluated and embryos with 8-16 cell embryos were biopsied and returned for individual culture on “well on the well” system.

##### Embryo biopsied:

The 8-16 cells embryos of all groups were transferred to 5 µL TALP-Hepes microdrops with equilibrated mineral oil. The procedure was carried out using micromanipulators (Narishige Co., Tokyo, Japan) attached to an inverted microscope (Carl Zeiss, Feldbach, Switzerland). After embryo immobilization with holding pipette, a 30 µm microneedle (Transfix, São Paulo, Brazil) was inserted through the zona pellucida at 3-o’clock position. The amount of removed cells was equivalent to one-fourth of the embryo (Polisseni et al., 2010). After biopsy, embryos were transferred back to in vitro culture at “well in the well” system to evaluate the development capacity.

### *For rat embryo*

#### Animals

Twelve-week-old female Wistar rats ( $n=18$ ) weighing approximately 160.0 g and 14 week old male Wistar rats of previously proven fertility were obtained from the vivarium of the Centre for Biology Reproduction (CBR), Juiz de Fora, Brazil. The animals were housed in a climate-controlled animal research facility at a temperature of 21°C and with a light / dark cycle of 12 / 12 hours. Standard rat chow (Nuvilab®, Paraná, Brazil) and filtered water were available *ad libitum*. This work was approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation-UFJF number 003/2009.

#### Superovulation

150 IU/kg of PMSG (Pregnant Mares Gonadotropin, Sigma - Catalog 4877-G) were administered to stimulate folliculogenesis, and 48 h later ovulation was induced with 75 IU/kg of hCG (Human Chorionic Gonadotropin, Sigma - Catalog G-8554) (Kon et al., 2005).

#### Embryo collection

On the following morning vaginal smears were performed. Females with signs of successful copulation (a "vaginal plug" and/or the presence of sperm in the smear) were euthanized 24 hours after hCG administration using a combination of 2% xylazine (10 mg/kg, Syntec, Cotia, SP) and 10% ketamine (90 mg/kg, Syntec, Cotia, SP). Oviducts and uterine horns were dissected and removed en bloc with the cranial vagina. They were then separated and placed in a 35 mm petri dish containing 1.0 ml of TALP HEPES medium (Gordon, 1994) pre-heated to 37°C. Embryo collection was performed separately from the oviduct and uterine horns using a 3.0 ml syringe and 30 gauge needle with the aid of magnifying stereomicroscopy. The recovered embryonic structures were counted and distributed randomly among culture groups.

#### Experimental groups of embryo culture

Embryos were randomly distributed into groups cultured in different media as follows:

- KSOM group: KSOM medium supplemented with 5% BSA,  $n=96$
  - Sequential media group: ECM/Multiblast (Irvine) until the third day after fertilization in ECM and then eight-cell blastocysts cultured in Multiblast supplemented with 5% BSA,  $n=103$
  - Single medium group: Global medium (Global Life) supplemented with 5% BSA,  $n=149$
- For all groups the embryos were cultured *in vitro* for 120 h at 37.0°C with 6% CO<sub>2</sub> and 95% humidity.

#### Evaluation of embryonic development

The cleavage rate was calculated at 72 h post-insemination (hpi). The total blastocyst rate and the proportion of embryos in different blastocyst stages (early blastocyst, blastocyst, expanded blastocyst, and hatched blastocyst) were calculated at 192 hpi in bovine embryos. In rat embryos the blastocyst rate was evaluated 120 hours after embryo collection.

Evaluation of the embryo stage was performed according to the parameters described in the Manual of the International Embryo Transfer Society (Stringfellow & Seidel. 1998). All rates were calculated based on the number of presumptive zygotes.

#### Statistical analyses

Data of cleavage and blastocyst rates and the proportion of embryos at different cell stages were analyzed by the chi-square test. Differences were considered significant at  $P<0.05$ .

## Results

A total of 861 COCs were selected from 201 ovaries. No significant difference was observed in the total cleavage and blastocyst rate among groups for biopsied bovine embryos (Table 1).

In contrast, there was a difference in blastocyst rate of rat embryo among groups ( $p<0.05$ ). The KSOM group had a similar proportion of blastocyst compared with that in the single medium group. Moreover, a greater proportion of expanded blastocysts were observed in the single medium group compared with that in sequential media. No statistical difference was found between groups in early blastocyst ( $P>0.05$ ) (Table 2).

## Discussion

The quality of culture is a crucial factor that influences the success of IVF (Hentemann & Bertheussen 2009; Sifer et al., 2009; Hambiliki et al., 2011; Ciray et al., 2012; Gerber et al. 2012). During preimplantation development in the oviduct and uterus, the embryo is exposed to different secretions according to its nutritional requirements and undergoes many structural changes (Reed et al., 2009; Sepulveda et al., 2009; Hambiliki et al., 2011; Gerber et al., 2012; Ciray et al., 2012). To highlight the differences among in vitro culture systems with different media, the present study compared embryonic development in two experimental model bovine and rat embryo between single and sequential media commonly used for human embryo culture.

This study found that single medium and sequential media systems used for human embryos result in similar cleavage and blastocyst rate among different media for biopsied bovine embryo used as a model. These findings were also consistent with another study using a bovine model (Lane et al., 2003), which showed that the culture environment is functionally efficient among culture systems (Table 1). We used biopsied embryos because we believed that embryos that underwent manipulation were structures more sensitive which could demonstrate a minimum difference between culture systems. On the other hand, despite being considered an aggressive technique to embryos, the fourth biopsy bovine embryo does not affect embryo development to the blastocyst stage (Polisseni et al., 2010) indicating that the performance of biopsy technique, before the formation of gap junctions between the blastomeres, does not reduce the capacity of biopsied embryo development (Almodin et al., 1999).

Furthermore, similar results among blastocyst rate of sequential and single media groups was associated with the use of selected embryos (8-16 cells bovine embryos) that was biopsied and the use of new culture system “well on the well” may be the explanation of results numerically more satisfactory than previous work. The culture for bovine biopsied embryo in this study was an individually system, developed by Vajta et al (2000), which involves combination of microdrop with a large volume of culture medium surrounding the embryo which is important to diffuse inadequate molecules in the medium and allows the researcher to follow the development of embryos individually, keeping the identity, especially those who have undergone some kind of treatment and micromanipulation (Pereira et al., 2005). Furthermore, the biopsy technique for bovine embryos of 8-16 cells, can be used, aiming at the assessment of chromosomal abnormalities and identification of molecular markers, while the embryos are still under cultivation, before transfer to the receptor.

For rat embryo the total blastocyst rate was lowest in the sequential media group (Table 2). Moreover, the single medium group had a higher percentage of expanded blastocysts compared with that in the sequential media group. This result is in agreement with previous studies of human embryos, which reported a greater proportion of zygotes develop toward expanded blastocysts in a single medium than that in sequential media (Sepulveda et al., 2009; Reed et al., 2009). The reason for the differences in developmental parameters may be attributed to the media ingredients that might affect the cell cycle of embryos. The basic difference among media is the presence of essential and non-essential amino acids during all

culture in the single culture medium, which have several roles in embryonic development as chelators, antioxidants, biosynthetic precursors and energy metabolism regulators (Summers & Biggers 2003; Ciray et al., 2012).

As noted, in our study, we did not make any embryo selection for rat embryo and all embryos obtained were utilized and in this situation, unselected embryo, demonstrated an optimal culture of single medium then sequential media. Consequently, the embryo diversity found in our study is similar to that found in ART patients (Polisseni et al., 2010). This study is the first prospective randomized study comparing two embryo culture systems, single medium and sequential media, in embryo evaluation utilizing two experimental models for human embryo. Our study was performed by the same embryologist for all steps and in the same laboratory to minimize as many variables as possible. In summary, using biopsied 8-16 cells bovine embryos as a model, we showed similar results of embryo development compared single and sequential media. Thus, utilizing unselected rat embryo as a model culture in a single medium increases blastocyst production and the percentage of expanded blastocysts which may benefit embryonic development more than does sequential media.

#### **Conflict of interests**

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### **Acknowledgments**

This study was funded by the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (APQ-01749-08) and Rede Mineira de Animais de Laboratório - FAPEMIG.

## References

- Almodin CG, Moron AF, Kulay Jr L, Kruger E, Pereira LAC, Minguetti-Câmara VC. Avaliação do desenvolvimento de embriões bovinos pós-biópsia: um modelo experimental. Rev Bras Ginecol Obst 1999;21:533-8.
- Baumann CG, Morris DG, Sreenan JM, Leese HJ. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. Mol Reprod Dev 2007;74:1345–1353.
- Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Biol Reprod 1983;28:235–247.
- Blake D, Svalander P, Jin M, Silversand C, Hamberger L. Protein Supplementation of Human IVF Culture Media. J Assist Reprod Genet 2002;19:137–143.
- Camargo LSA, Boite MC, Wohlres-Viana S, Mota GB, Serapiao RV, As WF, Viana JHM, Nogueira LAG. Osmotic challenge and expression of Aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. Cryobiology 2011;63:256-262.
- Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahcci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media - a sibling oocyte study. J Assist Reprod Genet 2012;29:891–900.
- Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, Biggers JD. Differentail growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. Biol Reprod 1994;50:1027-1033.
- Fiorenza MT, Bevilacqua A, Canterini, S et al. Early transcriptional activation of the Hsp70.1 gene by osmotic stress in one-cell embryos of the mouse. Biol Reprod 2004;70:1606-1613.
- Gerber S, Bossi R, Guimarães F, Valle M, Sampaio M. Effects of transfer of embryos independently cultured in essential and sequential culture media on pregnancy rates in assisted reproduction cycles. J Assist Reprod Genet; 2012. doi:10.1007/s10815-012-9835-6
- Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. CAB International, Wallingford, 1994.
- Hambiliki F, Sandell P, Yaldır F, Stavreus-Evers A. A prospective randomized sibling-oocyte study of two media systems for culturing cleavage-stage embryos - impact on fertilization rate. J Assist Reprod Genet 2011;28:335–341.
- Hawk HW, Wall RJ. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. Theriogenology 1994;41:1571–83.
- Hentemann M, Bertheussen K. New media for culture to blastocyst. Fertil Steril 2009;91:878–883.
- Kon H, Tohei A, Hokao R, Shinoda M. Estrous cycle stage-independent treatment of PMSG and hCG can induce superovulation in adult Wistar-Imamichi rats. Exp Anim 2005;54:185–187.
- Krisher RL. Utility of animal models for human embryo culture development: domestic species. Methods Mol Biol 2012;912:27–37.

- Lane M, Gardner DK, Hasler MJ, Hasler JF. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology* 2003;60:407–19.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986;25:591–600.
- Pereira DC, Dode MAN, Rumpf, R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 2005;63:1131–1141.
- Polisseni J, Sá WF, Guerra MO, Machado MA, Serapião RV, Carvalho BC et al. Post-biopsy bovine embryo viability and whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 2010;93:783–88.
- Reed ML, Hamic MA, Thompson DJ, Caperton CL. Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study. *Fertil Steril* 2009;92:1783–86.
- Sepulveda S, Garcia J, Arriaga E, Diaz J, Noriega-Portella L, Noriega-Hoces L. In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fertil Steril* 2009;91:1765–70.
- Sifer C, Handelsman D, Grange E, Porcher R, Poncelet C, Martin-Pont B, Benzacken B, Wolf J-P. An auto-controlled prospective comparison of two embryos culture media (GIII series versus ISM) for IVF and ICSI treatments. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:575–581.
- Stringfellow DA, Seidel SM. Manual da sociedade internacional de transferência de embriões. Savoy IL Press, São Paulo, 1998.
- Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update* 2003;9:557–582.
- Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Allesen H. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the well of the well (WOW) system. *Mol Reprod Dev* 2000;55:256–264.

**Tables****Table 1.** Development of bovine embryo fertilized in vitro, biopsied at 8-16 cell embryos and cultured in different medium.

Groups	N	Cleavage rate	8-16 cells embryos	Nº of biopsied embryos	Blastocyst rate
CR2aa	235	85.5%	32.8%	77	63.6%
G1/G2	228	79.4%	28.5%	65	64.6%
Global	161	79.7%	34.8%	56	55.3%
ECM/Multblast	233	76.8%	24.9%	58	53.4%

Note: Chi-square test. (P>0.05).

**Table 2.** Distribution of rat embryos 120 hours of culture at different stages of blastocysts.

Blastocyst				
Treatment	Overall	BI	BL	BX
KSOM (n=96)	24.0% <sup>(a)</sup> (23)	10.4% <sup>(a)</sup> (10)	3.1% <sup>(b)</sup> (3)	10.4% <sup>(a)</sup> (10)
Single médium (n=149)	32.9% <sup>(a)</sup> (49)	8.1% <sup>(a)</sup> (12)	6.7% <sup>(a)</sup> (10)	18.1% <sup>(a)</sup> (27)
Sequential media (n=103)	13.6% <sup>(b)</sup> (14)	2.9% <sup>(b)</sup> (03)	10.7% <sup>(a)</sup> (11)	0.0% <sup>(b)</sup> (0)

Note: Chi-square test. Different letters at the same stage of blastocysts shows statistical difference among treatments (P<0.05).

**11.3 Artigo aceito para publicação no Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida - 2013**

**IMPACT OF THE USE OF GONADOTROPINS ON EMBRYONIC DEVELOPMENT – A RAT MODEL**

**Impacto do uso de gonadotrofinas no desenvolvimento embrionário – modelo experimental rato**

**Gonadotropins and embryonic development**

Juliana Polisseni<sup>a, b, c</sup>, João Gabriel Viana de Grázi<sup>b</sup>, Martha de Oliveira Guerra<sup>b</sup>, Larissa Cabral Milen<sup>b</sup>, Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>a</sup>, Vera Maria Peters<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Brazilian Agricultural Research Company, Dairy Cattle, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup>Centre for Biology Reproduction, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup>Assisted Reproduction Clinic Pró-Criar/Monte Sinai, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

**Institution where the work was performed:** Centre for Biology Reproduction, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

**Assistance received in the form of funding:** This study was funded by the FAPEMIG - Research Support Foundation of the State of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (26/ and 31/2011).

**Congress where the study was presented:**

GRÁZIA, J. G. V.\* ; POLISSENI, J. ; MILEN, L. C. ; SOUZA, M. L. M. ; PETERS, V. M. ; GUERRA, M. O. . Avaliação da qualidade de embriões de ratas Wistar submetidas à superovulação. In: XXXIII Semana de Biologia da UFJF, 2010, Juiz de Fora. XXXIII Semana de Biologia da UFJF, 2010.

GRÁZIA, J. G. V. ; POLISSENI, J. ; MILEN, L. C. ; PETERS, V. M. ; GUERRA, M. O. . Avaliação do número e qualidade de zigotos e embriões em fases de duas a oito células de ratas wistar submetidas ao protocolo de superovulação. In: XVII Seminário de Iniciação Científica, 2011, Juiz de Fora. XVII Seminário de Iniciação Científica, 2011.

**Corresponding author:** Juliana Polisseni

Vicente Beguelli n 315, Dom Bosco, Juiz de Fora, Minas Gerais 36025-550, Brazil  
e-mail:Jupol@powermail.com.br, Tel: +55 (32) 3216-5092, fax: +55 (32) 3232-1315

**RESUMO:**

**Objetivo:** Avaliar o impacto da superovulação sobre o desenvolvimento embrionário inicial em ratos. **Métodos:** Experimento 1: Ratas Wistar foram superovuladas com PMSG seguido de hCG 48 horas depois. Os embriões foram coletados 24 h após a administração de hCG. Experimento 2: ratas Wistar ( $n = 16$ ) foram distribuídas entre os grupos controle e superovulado. Os embriões foram coletados 48 e 72 h após a administração de hCG. O número total de estruturas embrionárias e o grau de qualidade de embriões foram analisados pelo teste de Qui-quadrado. Já a diferença dos pesos dos ovários foi avaliada pelo teste t de Student. **Resultados:** Experimento 1: 931 embriões foram coletados de 66 animais, com média de  $16,3 \pm 9,5$  estruturas por animal. A superovulação foi bem sucedida em 89,4% dos animais, e 98,2% dos embriões obtidos a partir de animais superovulados foram viáveis. Experimento 2: O grupo superovulado apresentou ovários com maior peso, um maior número de embriões ( $P < 0,001$ ), quando comparado com o grupo controle. No entanto, os embriões do grupo superovulado apresentaram menor número de células em 72 horas após a administração de hCG ( $P < 0,001$ ). A maior porcentagem de embriões do grupo superovulado foi classificada como grau I ou II em relação aos embriões do grupo controle ( $P < 0,001$  e  $P = 0,008$ , respectivamente). **Conclusão:** A superovulação foi bem sucedida no modelo rato e resultou em um maior número de embriões coletados, por animal. Entretanto, embriões produzidos de ratas superovuladas apresentaram um desenvolvimento mais lento.

**Palavras-chave:** superovulação, o desenvolvimento do embrião, grau embrião, modelo animal

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the impact of *in vivo* superovulation on early embryonic development in a rat model. **Methods:** Experiment 1: Female Wistar rats were superovulated with injection of PMSG followed by hCG 48 hours later. Embryos were collected 24 h after hCG administration. Experiment 2: Female Wistar rats ( $n=16$ ) were distributed to a control or superovulated group. Embryos were collected 48 and 72 h after hCG administration. The total number of embryonic structures and the embryo quality grades were analyzed by Chi-squared test. Between-group differences in ovarian weight were assessed by Student's t-test. **Results:** Experiment 1: 931 embryos were collected from 66 animals, with a mean of  $16.3 \pm 9.5$  structures per animal. The superovulation was successful in 89.4% of the animals, and 98.2% of the embryos collected from superovulated animals were viable. Experiment 2: The superovulated group had heavier ovaries and produced more embryos than the control group ( $P < 0.001$ ); however, these embryos contained fewer cells than controls at 72 hours after hCG administration ( $P < 0.001$ ). A greater percentage of embryos from the superovulated group were classified as grade I or grade II relative to embryos from the control group ( $P < 0.001$  and  $P = 0.008$ , respectively). **Conclusion:** Superovulation was successful in the Wistar rat model and resulted in a greater number of embryos collected per animal. However, embryos produced as a result of superovulation developed more slowly than control embryos.

**Keywords:** superovulation, embryo development, embryo grade, animal model

## Introduction

Despite recent advances, the success rates for assisted reproductive technologies (ARTs) remain low. Understanding the factors that impact the outcome of ART may help to improve success rates (Chuang et al., 2010, Santos et al., 2010, Younis et al., 2012). One of these factors may be the ovarian stimulation associated with superovulation.

The specific protocols used for controlled ovarian stimulation may be an aspect of assisted reproduction therapy that influences the outcome of the treatment (Chuang et al., 2010). In mammals, the ovary contains a large number of dormant immature follicles that are activated over the animal's reproductive lifespan. Pituitary gonadotropins, ovarian steroids, and peptide hormones cooperate to ensure further growth and development of the activated follicles. A single dominant follicle eventually emerges, ovulates, and then involutes to allow the activation of the next group of follicles (Wu et al., 2007; Woodruff & Shea, 2011). Both women and animals may receive treatment with exogenous gonadotropins to allow retrieval of multiple oocytes during a single menstrual/estrous cycle. Exogenous gonadotropin treatment usually consists of equine chorionic gonadotropin (eCG)/Pregnant Mare Gonadotropin (PMSG), which acts by inducing the growth of multiple follicles, followed by human chorionic gonadotropin (hCG), which promotes oocyte maturation and ovulation (Combelles & Albertini, 2003; Kagabu & Umezawa, 2006).

However, there is still controversy over the effects of ovarian stimulation by gonadotropic hormones on subsequent embryonic development. Gonadotropin stimulation appears to have a direct impact on oxidative stress markers, induce the production of free radicals, and possibly decrease the conception rate (Younis et al., 2012). In addition, the optimal conditions necessary for implantation are altered following ovarian stimulation, possibly because of changes in the coordination of folliculogenesis and oogenesis (Combelles & Albertini, 2003; Ziebe et al., 2004; Sotomaru et al., 2005; Ghaemi et al., 2008). Further studies are needed to clarify whether the use of gonadotropic hormones in ARTs has an effect on embryo development (Santos & Macklon, 2010).

The success of ART depends on the quality of the embryos used for embryo transfer, and improvements in embryo quality may enhance the rates of implantation, pregnancy and live birth (Lee et al., 2012). Many parameters can be used to select embryos for transfer, but embryo morphology is the most commonly used criterion to assess embryo quality. However, since many investigators have raised doubts about the correlation between morphological features and pregnancy rates (Li et al., 2004), the degree of cellular fragmentation and the number of blastomeres per embryo are other main factors used for embryo selection. In addition, early cleavage rate may also influence the potential of the embryo to successfully implant (Lee et al., 2012).

In this study we evaluate the relationship between superovulation and embryo quality. We utilize gonadotropic hormones to cause superovulation in a rat model to examine the role of superovulation in folliculogenesis and ovulation *in vivo*. In addition, the effects of superovulation on the quality of early embryonic development (number of cells, speed of cleavage, grade of embryo) were assessed.

## Material and methods

### Chemicals

All chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), unless otherwise indicated.

### Animals

Twelve-week-old female Wistar rats weighing approximately 160.0 g and 14 week old male

Wistar rats of previously proven fertility were obtained from the vivarium of the Centre for Biology Reproduction (CBR), Juiz de Fora, Brazil. The animals were housed in a climate-controlled animal research facility at a temperature of 21°C and with a light / dark cycle of 12 / 12 hours. Standard rat chow (Nuvilab®, Paraná, Brazil) and filtered water were available *ad libitum*. This work was approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation-UFJF number 003/2009.

#### **Superovulation**

150 IU/kg of PMSG (Pregnant Mares Gonadotropin, Sigma - Catalog 4877-G) were administered to stimulate folliculogenesis, and 48 h later ovulation was induced with 75 IU/kg of hCG (Human Chorionic Gonadotropin, Sigma - Catalog G-8554) (Kon et al., 2005). Injections were intraperitoneal and control animals received injections of normal saline at equivalent time points.

#### *Experiment 1: Is superovulation effective in stimulating folliculogenesis and in vivo ovulation?*

Sixty six female Wistar rats aged 12 weeks were superovulated as described above. Immediately after hCG administration the female rats were moved into individual cages and mated with a male of proven fertility. On the following morning vaginal smears were performed. Females with signs of successful copulation (a "vaginal plug" and/or the presence of sperm in the smear) were euthanized 24 hours after hCG administration using a combination of 2% xylazine (10 mg/kg, Syntec, Cotia, SP) and 10% ketamine (90 mg/kg, Syntec, Cotia, SP). Oviducts and uterine horns were dissected and removed en bloc with the cranial vagina. They were then separated and placed in a 35 mm petri dish containing 1.0 ml of TALP HEPES medium (Gordon, 1994) pre-heated to 37°C. Embryo collection was performed separately from the oviduct and uterine horns using a 3.0 ml syringe and 30 gauge needle with the aid of magnifying stereomicroscopy. The recovered embryonic structures were counted and examined using an inverted microscope to evaluate their viability.

#### *Experiment 2: Does superovulation affect early embryo development?*

Sixteen female Wistar rats were divided into control and superovulated groups. Superovulation, mating, euthanasia and embryo collection were performed as described above at 48 and 72 h after hCG administration. The ovaries were separated from the oviducts and weighed using an analytical balance. Embryos recovered from superovulated and control animals were examined using an inverted microscope. The total number of cells was counted and embryo quality was assessed according to the parameters described in the Handbook of the Latin American Network of Assisted Reproduction (Ahumada et al., 2006); these include assessment of blastomere symmetry, homogeneity and staining of the cytoplasm, and the presence of cytoplasmic fragmentation (Table 1).

#### **Statistical analysis**

Between-group differences in the total number of embryos structures obtained, embryo quality classification, and the number of blastomeres per embryo were assessed using a Chi-squared test. Differences in ovarian weight were assessed by Student's t-test. Differences were considered statistically significant if  $P < 0.01$ .

## **Results**

#### *Experiment 1*

Superovulation was successful in 59 of 66 animals (89.4%). A total of 931 structures were collected from 66 animals, of these 914 (98.2%) were viable embryos. The mean number of structures per animal was  $16.3 \pm 9.5$ .

#### *Experiment 2*

Superovulated animals had heavier ovaries than controls ( $P < 0.001$ ) (Figure 1). This was expected since gonadotropin increases the number of ovulatory follicles, and therefore the number of embryos. The total number of embryos collected from each group at 48 and 72 hours combined was 48 from the control group versus 97 from the superovulated group) ( $P < 0.001$ ).

A greater percentage of two cell embryos were collected from the superovulated group than the control group (53/97 (54.6%) versus 16/48 (33.3%), respectively), ( $P < 0.001$ ). This was especially evident at 72 hours after hCG administration; most (45/87) of the embryos from the superovulated rats had two cells at this time, whereas the majority of embryos from control rats had 4 cells (Table 2). These differences in the percentages of the embryos with different cell numbers were significant at both the 2 ( $P < 0.001$ ) and 4 ( $P = 0.003$ ) cell stage.

Significant differences in embryo quality were seen only at 72 hours after hCG administration. At this time, a higher number of grade I and grade II structures were collected from the superovulated group than the control group ( $P < 0.001$  and  $P = 0.008$  for grade I and grade II, respectively) (Table 3). Since embryo quality is assessed based on blastomere symmetry and cytoplasmic fragmentation, this result may be due to the predominance of two cell embryos in the superovulated group at 72 hours after hCG administration; two cell embryos generally have good symmetry and rare fragmentation.

## Discussion

Controlled ovarian stimulation is frequently used with IVF to obtain multiple oocytes. Processes that occur during oocyte development within the follicle establish the foundation for embryogenesis; oocyte growth and development occurs involves highly coordinated proliferation and differentiation of theca and granulosa cells. This coordination can be disrupted by exogenous gonadotropins, which may influence subsequent conception (Wu et al., 2007; Younis et al., 2012). This study demonstrates that although the technique used for superovulation was successful, initial embryonic development was significantly slower in embryos from superovulated animals. These results may indicate that, at least in Wistar rats, superovulation affects the developmental potential of the embryos obtained using this procedure.

The 89.4% success rate that we obtained for our superovulation technique was similar to that reported in other studies using the same technique (Popova et al., 2005); however, individual variation in obtaining a stable number of structures was an obstacle in this study (Experiment 1). These difficulties are also reported in literature (Popova et al., 2002; Kito et al., 2010). It is important to emphasize that it is possible to collect as many as 33 structures from only one animal; consistent collection of large numbers of structure per animal could minimize the number of animals needed in future studies.

For this study we chose the rat as an experimental model because of their genetic similarity to humans and the frequency with which rodents are used in biomedical research. Their great availability, ease of handling, short gestation period, and metabolic homology to humans make rats a common choice as an experimental animal. Recently, it has been proposed that the rat model also be used as a tool for monitoring the quality of materials, culture conditions, techniques, and equipment used in IVF laboratories, and as a bioassay for evaluating the potential effects of environmental contaminants on fertilization and early embryogenesis (Perin et al., 2007).

Experiment 2 demonstrated that gonadotropins increase the number of ovulatory follicles, the number of oocytes and, consequently, the ovarian weight and number of embryos collected ( $P < 0.001$ ) (Edwards et al., 2004; Kon et al., 2005; Ishigame et al., 2005; Kelley et al., 2006). The results of this study also suggest that superovulation can cause a delay in the *in vivo* development of Wistar rat embryos ( $P = 0.001$ ) (Table 2). Our results are

similar to those of Ertzeid & Storeng (2001), McKiernan & Bavister (1998) and Van der Auwera & D'Hooge (2001), who used superovulated hamsters and also observed a fewer cells in the embryos of superovulated animals. This delay in embryonic development in the superovulated group may be explained by a change in the timing of ovulation, with more ovulations occurring later in superovulated animals (McKiernan & Bavister, 1998). In addition, the increase in the number of structures in the female reproductive tract places greater demand on the nutrients available for early embryonic development (Ghaemi et al., 2008). Importantly, the differences in embryo development between superovulated and control animals are more evident at 72 hours after hCG administration than at 48. Progression of embryonic development from the two cell stage appears to be related to the time of embryonic genome activation, which requires a suitable microenvironment to be present in both the oviduct and the uterus (Lawitts & Biggers, 1991; Schult, 2002). Lee et al. (2012) demonstrated that embryos that undergo early cleavage tend to be better quality embryos. Our results demonstrate retarded development of embryos from superovulated animals, which indicates a poor prognosis for successful use in IVF. Recently, it has been hypothesized that increased rates of embryo aneuploidy may result from ovarian stimulation interfering with the natural selection of good quality oocytes, or from detrimental effects of hyperstimulation on follicle growth and oocyte maturation (Verberg et al., 2009).

Assessment of embryo quality parameters revealed that more grade I and grade II embryos were obtained from superovulated animals than controls (Table 3). This can be explained by the developmental stage of the embryos in the superovulated group. During cell division the formation of fragments (so-called cellular debris) occurs (Moore & Persaud 2004). As the majority of embryos in the superovulated group were still in the two cell stage 72 hours after hCG administration (Table 3) the likelihood of fragmentation, and also of asymmetry between the cells, was lower. This result differs from that reported by Ziebe et al. (2004), who demonstrated that embryos from superovulated humans were similar in quality to those of control subjects. Recently, investigators demonstrated an association between free fatty acids and the ovarian response to gonadotropins in women undergoing IVF, with higher fatty acids associated with poorer ovarian follicular function, poorer oocyte quality, and lower embryo implantation rates (Younis et al., 2012). In addition, Chuang et al. (2010) demonstrated that prolonged gonadotropin stimulation correlates with reduced clinical pregnancy and live birth rates after ART.

In summary, our results demonstrate that superovulation can be successful in a Wistar rat model, but that it causes slower embryonic development despite no negative impacts on embryo quality. Our data contribute to the growing consensus in the literature that suggests a detrimental impact of superovulation on the success of ART.

### **Conflict of interests**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

This study was funded by the FAPEMIG - Research Support Foundation of the State of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (26/ and 31/2011). We thank João Henrique Moreira Viana for assistance in developing the work.

### **References**

Ahumada A, Olmedo SB, Liebermann J, Mauri AL, Medina R, Posada MN, Roblero L, Rosemberg E et al (2006) Procedimentos de Reprodução Assistida. In: Franco JG Jr (ed)

Manual de procedimentos. Laboratório de Reprodução Assistida. REDLARA, São Paulo pp 29–48

Chuang M, Zapatins A, Taylor M, Jindal SK, Neal-Perry GS, Lieman HJ, Polotsky AJ (2010) Prolonged gonadotropin stimulation is associated with decreased ART success. *J Assist Reprod Genet* 27:711–717

Combelles CMH, Albertini DF (2003) Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse. *Biol Reprod* 21:812–821

Edwards LJ, Kind KL, Armstrong DT, Thompson JG (2004) Effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on embryo development in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 228: 45–51

Ertzeid G, Storeng R (2001) The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod* 16:221–225

Ghaemi SR, Salahnia M, Valojerdi MR (2008) The effect of progesterone and exogenous gonadotropin on preimplantation mouse embryo development and implantation. *Exp Anim* 57:27–34

Gordon I. (1994) Laboratory production of cattle embryos. CAB International, Wallingford

Ishigame H, Medan MS, Kawaguchi M, Fukuda A, Watanabe G, Arai KY, Taya K (2005) Induction of superovulation by immunoneutralization of endogenous inhibin in immature rats. *J Reprod Develop* 51:559–566

Kagabu S, Umez M (2006) Variation with age in the numbers of ovulated ova and follicles of Wistar-Imamichi adult rats superovulated with eCG-hCG. *Exp Anim* 55:45–48

Kelley RL, Kind KL, Lane M, Robker RL, Thompson JG, Edwards LJ (2006) Recombinant human follicle-stimulating hormone alters maternal ovarian hormone concentrations and the uterus and perturbs fetal development in mice. *Am J Endocrinol Metab* 29:761–770

Kito S, Yano H, Ohta Y, Tsukamoto S (2010) Superovulatory response, oocyte spontaneous activation, and embryo development in WMN/Nrs inbred rats. *Exp Anim* 59:35–45

Kon H, Tohei A, Hokao R, Shinoda M (2005) Estrous cycle stage-independent treatment of PMSG and hCG can induce superovulation in adult Wistar-Imamichi rats. *Exp Anim* 54:185–187

Lawitts JA, Biggers JD (1991). Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium. *Biol Reprod* 45:245–251

Lee MJ, Lee RK, Lin MH, Hwu YM (2012). Cleavage speed and implantation potential of early-cleavage embryos in IVF or ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet* 29:745–750

Li W, Daya S, Gunby J (2004) Faster embryo growth rate in vitro increases probability of pregnancy in assisted reproduction cycles. *J Assist Reprod Genet* 1271:143–146

- Mckiernan SH, Bavister BD (1998) Gonadotrophin stimulation of donor females decreases post-implantation viability of cultured one-cell hamster embryos. *Human Reprod* 13:724–729
- Moore KL, Persaud TVN (2004) Primeira semana do desenvolvimento humano. *Embriologia básica*, Elsevier, Rio de Janeiro
- Perin PM, Maluf M, Foltran DAN, Januario B, Saldiva PHN (2008) Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization mouse model. *Fertil Steril* 90:1503–1510
- Popova E, Krivokharchenko A, Ganten D, Bader M (2002) Comparison between PMSG- and FSH-induced superovulation for the generation of transgenic rats. *Molec Reprod Develop* 63:177–182
- Popova E, Bader M, Krivokharchenko A (2005) Strain differences in superovulatory response, embryo development and efficiency of transgenic rat production. *Transgenic Research* 14:729–738
- Santos MA, Kuijk EW, Macklon NS (2010) The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reprod* 139:23–34
- Schultz, RM (2002) The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Human Reprod Update* 8:323–331
- Sotomaru Y, Kamisako T, Hioki K (2005) Estrous stage- and animal age-independent superovulation in the BrlHan:WIST@Jcl (GALAS) Rat. *Exp Anim* 54:137–141
- Van der Auwera I, D'hooghe T (2001) Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod* 16:1237–1243
- Verberg MF, Macklon NS, Nargund G, Frydman R, Devroey P, Broekmans FJ, Fauser BC (2009) Mild ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update* 15:13–29
- Woodruff TK, Shea LD (2011) A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. *J Assist Reprod Genet* 28:3–6
- Wu J, Xu B, Wang W (2007) Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on the developmental competence of porcine preantral follicle oocytes grown in vitro. *J Assist Reprod Genet* 24:419–424
- Ziebe S, Bangsboll S, Schmidt KLT, Loft A, Lindhard A, Nyboe A (2004) Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. *Hum Reprod* 19:1457–1460
- Younis A, Clower C, Nelsen D, Butler W, Carvalho A, Hok E, Garelnabi M (2012) The relationship between pregnancy and oxidative stress markers on patients undergoing ovarian stimulations. *J Assist Reprod Genet* 29:1083–1089

## Tables

**Table 1.** Embryo classification system.

GRADE	PARAMETERS
I	Embryo with blastomeres of equal size, no cytoplasmic fragments and clear, homogeneous cytoplasm.
II	Embryo with blastomeres of equal size and less than 30% of the cells contain cytoplasmic fragments.
III	Embryo with blastomeres of different sizes; no cytoplasmic fragments.
IV	Embryo with blastomeres of equal or unequal size, with 30% to 50% of the cells contain cytoplasmic fragments.
V	Embryo with more than 50% of the cells contain cytoplasmic fragments.

**Table 2.** Stage of development of embryos from superovulated and control rats at 48 and 72 hours after hCG treatment.

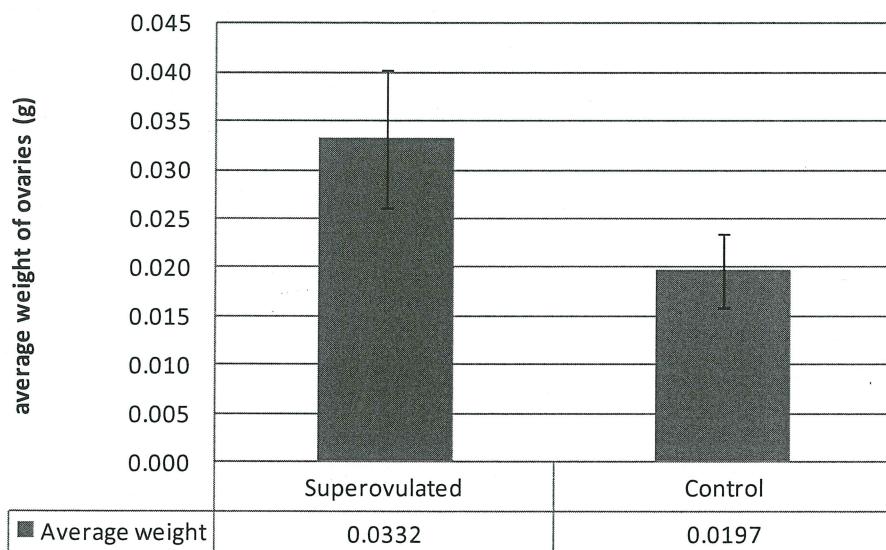
Treatment	DAY 2 – 48h			DAY 3 – 72 h		
	Superovulated	Control	P value	Superovulated	Control	P value
2 cell	8 (80.0%) <sup>(a)</sup>	15 (83.3%) <sup>(a)</sup>	0.144	45 (51.7%) <sup>(a)</sup>	1 (5.0%) <sup>(b)</sup>	<0.001
3 cell	0	0	NS	11 (12.6%) <sup>(a)</sup>	7 (35.0%) <sup>(a)</sup>	0.345
4 cell	0 <sup>(a)</sup>	3 (16.7%) <sup>(a)</sup>	0.083	30 (34.5%) <sup>(a)</sup>	11 (55.0%) <sup>(b)</sup>	0.003
5 cell	0	0	NS	1(1.2%) <sup>(a)</sup>	1 (5.0%) <sup>(a)</sup>	1
Degenerated	2 (20.0%) <sup>(a)</sup>	8 (30.8%) <sup>(a)</sup>	0.057	0	2	0.157
Total	10 <sup>(a)</sup>	26 <sup>(a)</sup>	0.868	87 <sup>(a)</sup>	22 <sup>(b)</sup>	0.001

Note: Between-group differences assessed by Chi-squared test. Different letters at the same stage of development indicate a statistically significant difference between treatment groups on that specific day.

**Table 3.** Embryo quality grades at 48 and 72 hours after hCG treatment.

Treatment	DAY 2 – 48h			DAY 3 – 72 h		
	Superovulated	Control	P value	Superovulated	Control	P value
Grade I	5 (50.0%) <sup>(a)</sup>	13 (50.0%) <sup>(a)</sup>	0.059	56 (64.5%) <sup>(a)</sup>	7 (31.8%) <sup>(b)</sup>	<0.001
Grade II	2 (20.0%) <sup>(a)</sup>	0	0.157	7 (8.0%) <sup>(a)</sup>	0 (0%) <sup>(b)</sup>	0.008
Grade III	1 (10.0%) <sup>(a)</sup>	3 (11.5%) <sup>(a)</sup>	0.317	17 (19.5%) <sup>(a)</sup>	6 (27.3%) <sup>(a)</sup>	0.021
Grade IV	0	2 (7.7%) <sup>(a)</sup>	0.157	7(8.0%) <sup>(a)</sup>	3 (13.6%) <sup>(a)</sup>	0.205
Grade V	0	0	NS	0(0%) <sup>(a)</sup>	4 (18.2) <sup>(a)</sup>	0.045

Note: Between-group differences assessed by Chi-squared test. Different letters at the same grade indicate a statistically significant difference between treatment groups on that specific day (P<0.01).

**Figure**

**Fig. 1** Average weight of ovaries in grams from the superovulated and the control group. Student's *t*-test showed a significant between-group difference ( $P < 0.001$ ).

## 11.4 Artigo publicado na revista interdisciplinar de modelos experimentais - 2009

110

### ARTIGO ORIGINAL

## TÉCNICA DE TUNEL EM EMBRIÕES DE RATAS WISTAR: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E DA CAPACIDADE DE DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES

*TUNEL TECHNIQUE IN WISTAR RATS EMBRYOS: EVALUATION OF QUALITY AND DEVELOPMENT CAPACITY OF EMBRYOS*

*Juliana Polisseni\*, Raquel Varella Serapião\*\*, Paulo Henrique de Almeida Campos Júnior\*\*\*, João Gabriel Viana de Grázia\*\*\*\*, Larissa Cabral Milen#, Luis Sérgio de Almeida Camargo##, Martha de Oliveira Guerra##, Vera Maria Peters###*

#### RESUMO

A técnica do TUNEL tem se mostrado eficiente como indicadora de qualidade embrionária em embriões bovinos e de camundongos. Entretanto, em ratos, a técnica não é amplamente utilizada. Objetivou-se avaliar a qualidade do desenvolvimento de embriões de ratas Wistar e o uso da técnica de TUNEL. Animais (n=8) foram superovulados através da injeção intraperitoneal de 150 UI/kg de peso via intraperitoneal (IP) de PMSG (Pregnant Mare Gonadotropin) e de 75 UI/kg de hCG 48h após. Fêmeas superovuladas foram colocadas para acasalar. 107 embriões de 4-8 células foram coletados 72 horas após hCG e cultivados em meio KSOM com 5% albumina sérica humana (BSA), em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade a 37,0°C, por 48 horas. Após o cultivo, foi calculada a taxa de blastocisto e realizada a técnica do TUNEL. A taxa de blastocisto foi de 83,17% (89/107), com 19,62% (21/107) de blastocisto inicial, 14,01% (15/107) de blastocisto, e 49,53% (53/107) de blastocisto expandido. O número total de blastômeros foi de 28,82±4,76. A taxa apoptótica foi de 10,32 ± 8,91% e 94% (31/34) dos embriões apresentavam pelo menos uma célula apoptótica. Em conclusão, a técnica de TUNEL se mostrou viável na avaliação da qualidade embrionária de embriões de ratas Wistar.

#### PALAVRAS - CHAVE

Blastocisto. apoptose. desenvolvimento embrionário. TUNEL.

#### ABSTRACT

The TUNEL technique has proven to be efficient as indicator of embryo quality in cattle and mice. Although the technique is not yet widely used in rats. Thus the aim of this study was to evaluate the quality of Wistar rat embryos and the use of the TUNEL technique. Animals (n=8) were superovulated by intraperitoneal injection of 150 IU/kg PMSG (Pregnant Mare Gonadotropin) and 75 IU/kg 48h after hCG. Superovulated females were placed with males at a ratio of 1/1. 107 4-8 cells embryos were collected 72 hours after hCG and were cultured in KSOM medium with 5% bovine serum albumin (BSA), for 48h ,with 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidity at 37,0°C. After cultured, the blastocyst rate was calculated and the TUNEL technique was performed. The blastocyst rate was 83.17% (89/107), with 19.62% (21/107) of initial blastocyst, 14.01% (15/107) of blastocyst and 49.53% (53 / 107) of expanded blastocyst. The total number of blastomeres was 28.82 ± 4.76. The apoptotic cells rate was 10.32 ± 8.91% and 94% (31/34) of embryos had at least one apoptotic cell. In conclusion, the TUNEL technique showing that it can be used to evaluation embryo quality, in Wistar rats embryos.

#### KEY WORDS

Blastocyst. apoptotic. embryo development. TUNEL.

\* Doutoranda do curso de Pós-graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). jupol@powermail.com.  
 \*\* Pesquisador da Embrapa Gado de Leite do Laboratório de Reprodução Animal. rscrapi@yahoo.com.br.  
 \*\*\* Estagiário do laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite. phacj@ig.com.br.  
 \*\*\*\* Estagiário do Centro de Biologia da Reprodução, UFJF. jjgrazia@gmail.com.  
 # Estagiário do Centro de Biologia da Reprodução, UFJF. larissamilen@yahoo.com.br.  
 ## Pesquisador da Embrapa Gado de Leite do Laboratório de Reprodução Animal. camargo@cnpl.embrapa.br.  
 ### Pesquisador do Centro de Biologia da Reprodução Animal,UFJF. martha.guerra@ufjf.edu.br.  
 #####Pesquisador do Centro de Biologia da Reprodução Animal, UFJF. Peters.vera@ufjf.edu.br.  
 Correspondence author: Juliana Polisseni. Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro de Biologia da Reprodução, Campus Universitário, Caixa Postal 328, CEP 36001-970, Juiz de Fora, MG – Brasil. jupol@powermail.com.  
 Received: 18/06  
 Accepted: 11/08

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da biologia molecular tem propiciado uma melhor compreensão dos mecanismos biológicos celulares. A apoptose, forma programada de morte celular, é um processo de regulação de populações e linhagens celulares nos sistemas de mamíferos. É caracterizada por fragmentação citoplasmática e nuclear, condensação de cromatina e fagocitose (VANDAELE et al., 2007).

Uma técnica que tem se mostrado eficiente na marcação de células apoptóticas embrionárias é o TUNEL. Esta consiste na utilização da enzima terminal deoxinucleotidil transferase (TdT) – mediated d-UTP nick end-labelling, que promove a ligação da

fluoresceina na 3'OH do DNA degradado (BYRNE et al., 1999). Através da relação de número de blastômeros intactos com o número de blastômeros danificados e o índice apoptótico, é possível avaliar a qualidade do desenvolvimento embrionário (KELKAR; DHARMA; NANDEDKAR, 2003).

Ultimamente, tem-se relacionado a apoptose celular às condições desfavoráveis a que o embrião é submetido durante o processo de cultivo *in vitro*. Acredita-se que este processo de morte celular tem a função de eliminar embriões anormais durante o primeiro ciclo celular em camundongos e no segundo ciclo celular em bovinos e humanos. Portanto, a apoptose tem sido utilizada como indicadora de qualidade embrionária (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002; VANDAELE et al., 2007).

Desta forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade do desenvolvimento de embriões de ratas Wistar, avaliando a taxa de blastocisto e utilizando a técnica do TUNEL para detecção de células apoptóticas nos embriões.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS

Foram utilizadas oito ratas Wistar ( $n=8$ ) com peso médio de 170,0 g e aproximadamente 12 semanas de vida, provenientes do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), Juiz de Fora, MG. Os animais foram mantidos em gaiolas dispostas em estantes climatizadas, com temperatura de 21°C, submetidas ao ciclo claro/escuro de 12 horas e tiveram livre acesso à água e ração.

### 2.2 SUPEROVULAÇÃO, COLETA EMBRIONÁRIA

Os animais foram superovulados através da injeção intraperitoneal de 150 UI/kg de peso de PMSG (Pregnant Mare Gonadotropin) e após 48h, a indução da ovulação foi realizada com 75 UI/kg de hCG (Human Chorionic Gonadotropin) (KAGABU; UMEZU, 2006). Imediatamente após a superovulação, as fêmeas foram separadas em gaiolas e colocadas com machos de fertilidade comprovada, na proporção de um macho para uma fêmea. Na manhã do dia seguinte, foi realizado o esfregaço vaginal com a finalidade de verificar a cópula. Para a coleta dos embriões, 72hs após hCG, as fêmeas foram eutanasiadas utilizando-se sobredose de anestésico (KON et al., 2005). Os embriões recuperados, através da lavagem dos ovidutos e cornos uterinos, foram cultivados em meio KSOM suplementado com 5% de albumina sérica bovina (BSA) em estufa incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade a 37,0°C, por 48 horas (KON et al., 2005; KAGABU; UMEZU, 2006).

### 2.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA

A taxa de produção de blastocisto foi avaliada quarenta e oito horas após o início do cultivo embrionário, segundo os parâmetros descritos no Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (STRINGFELLOW; CROWE, 1998).

A verificação do índice apoptótico foi realizada segundo KADER et al. (2008). Blastocistos de ratas Wistar foram lavados em PBS acrescido de 0,1% de BSA e fixados em fomaldeído a 4% a 4°C, por 25 minutos. Após o processo de fixação, os embriões foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,2%) por 5 minutos, lavados e equilibrados em tampão de equilíbrio por 5 a 10 minutos. Em seguida, foram incubados em tampão de incubação (tampão de equilíbrio, mix de nucleotídeo e enzima rTdT) por 1h a 37°C em atmosfera umidificada. Para controle da reação foi confeccionado um controle negativo, no qual o tampão de incubação a enzima rTdT foi substituído por água para não ocorrer a reação. Após o período de incubação, os embriões foram transferidos para lâmina siliconizada, corados com VECTASHIELD e DAPI, recobertos com lamínula e observados em microscópio de fluorescência. O número total de células foi obtido a partir da observação das células coradas pelo DAPI e visualizados em azul no filtro 460nm. Células em apoptose foram identificadas pela fluoresceina, corando-se de cor verde, observadas através do filtro 520±20nm. O índice apoptótico foi calculado a partir da relação do número total de células e o número de células apoptóticas, através do programa IMAGEJ. Já a taxa de produção de blastocisto foi expressa em porcentagem. As variáveis descontínuas foram normalizadas através da transformação logarítmica (número de blastômeros apoptóticos) e de arcoseno (taxa de apoptose) e foram submetidas à ANOVA a 5% de significâncias, com auxílio do software SAEG.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da UFJF, recebendo o número do protocolo 002/2009.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o potencial de desenvolvimento e qualidade embrionária, através da taxa de produção de blastocisto e número de células apoptóticas, utilizando-se embriões de ratas Wistar. Foram coletados 107 embriões, no estádio de 4-8 células, em oito ratas Wistar superovuladas. O Quadro 1 mostra o número de embriões, por estádio de desenvolvimento, após 48 horas de cultivo. A taxa de blastocisto foi semelhante à encontrada por KADER et al. (2008), demonstrando que o cultivo foi eficiente no que diz respeito ao desenvolvimento embrionário.

Para análise de células apoptóticas, através da técnica de TUNEL, 34 embriões foram fixados (Figura 1A). A fragmentação no blastocisto foi identificada conforme se verifica na Figura 1B, observa-se o controle onde a enzima foi omitida na Figura 1C. O índice apoptótico por blastocisto encontra-se no Quadro 2.

É verdade que a qualidade de embriões cultivados in vitro ainda apresenta características morfológica e fisiológica inferiores aos produzidos in vivo. As alterações ultra-estruturais observadas com mais frequência são: redistribuição de organelas na região cortical e agregação citoplasmática, vacuolização e rompimento da membrana e/ou matriz mitocondrial, culminando num processo de apoptose e morte celular (LI et al., 2000). A condição desfavorável encontrada no cultivo in vitro foi demonstrada, neste estudo, pela presença de pelo menos uma célula apoptótica em 94% (31/34) dos embriões. O resultado está de acordo com resultados encontrados na literatura, onde foi demonstrada uma taxa de 87% de apoptose para embriões de bovinos (LEE et al., 2009). O número de células apoptóticas também foi semelhante ao encontrado no estudo de KADER, et al. (2008), que utilizou blastocistos de camundongos.

É importante ressaltar que, independente do modelo experimental utilizado, nem sempre a morte celular ocorre em função de efeitos extracelulares, mas também pode estar relacionada a efeitos fisiológicos intracelulares como: estímulos, sinalização entre células e regulação (LI et al., 2009).

Os resultados encontrados indicam a possibilidade de se realizar a avaliação da qualidade embrionária de embriões de ratas através da produção de blastocisto e número de células apoptóticas. Este fato tem grande importância já que, através da análise comparativa preliminar do genoma humano, foi demonstrado que roedores parecem o modelo experimental mais eficiente para estudos de regulação e controle de desenvolvimento embrionário em nível molecular, tornando-se o modelo experimental para estudos pré-clínicos em humanos (BAUMANN et al., 2007).

Quadro 1: Número total de estruturas coletadas (N) e embriões em diferentes estádios de desenvolvimento: mórulas (MOR), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (BL), blastocisto expandido (Bx) e estruturas degeneradas (DEG) após cultivo por 48 horas, de embriões de ratas Wistar superovuladas

Repetição	Nº embriões coletados	Cinética de desenvolvimento (n)			Taxa de Blastocisto (%)
		Bi	BL	BX	
1	78	21	15	27	80,76 (63/78)
2	29	0	0	26	89,65 (26/29)

Quadro 2: Número total de blastômeros, número de blastômeros apoptóticos e taxa de apoptose em embriões de ratos avaliados através da técnica de TÚNEL.

Repetição	Nº blastocistos fixados	Nº total de Blastômeros	Nº blastômeros Apoptóticos	Taxa de apoptose (%)
1	21	29,5±3,75 a	2,25±1,36 a	8,03±5,74a
2	13	28,0±5,85a	3,1±1,97a	12,8±11,61a

Médias seguidas de letras iguais não diferiram significativamente entre si ( $P<0,05$ ).

#### 4 REFERÊNCIAS

BAUMANN, C. G.; MORRIS, D. G.; SREENAN, J.M.; et al. The Quiet Embryo Hypothesis: Molecular Characteristics Favoring Viability. *Molecular Reproduction and Development*, New York, v. 74, n. 10, p. 1345-1353, 2007.

BYRNE, A. T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H. J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *Journal Reproduction and Fertility*, Manchester, v. 117, n. 1, p. 97-105, 1999.

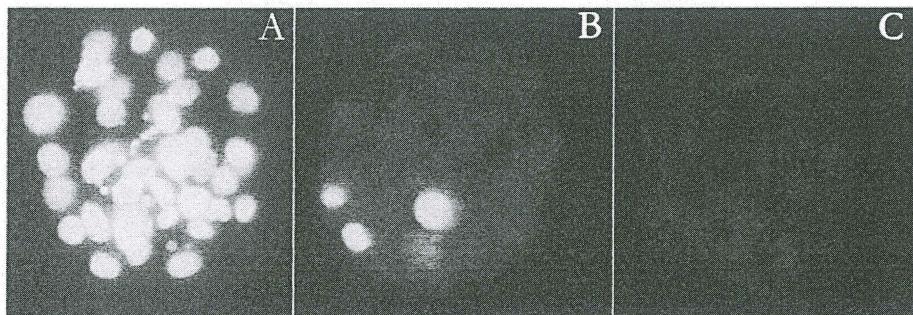
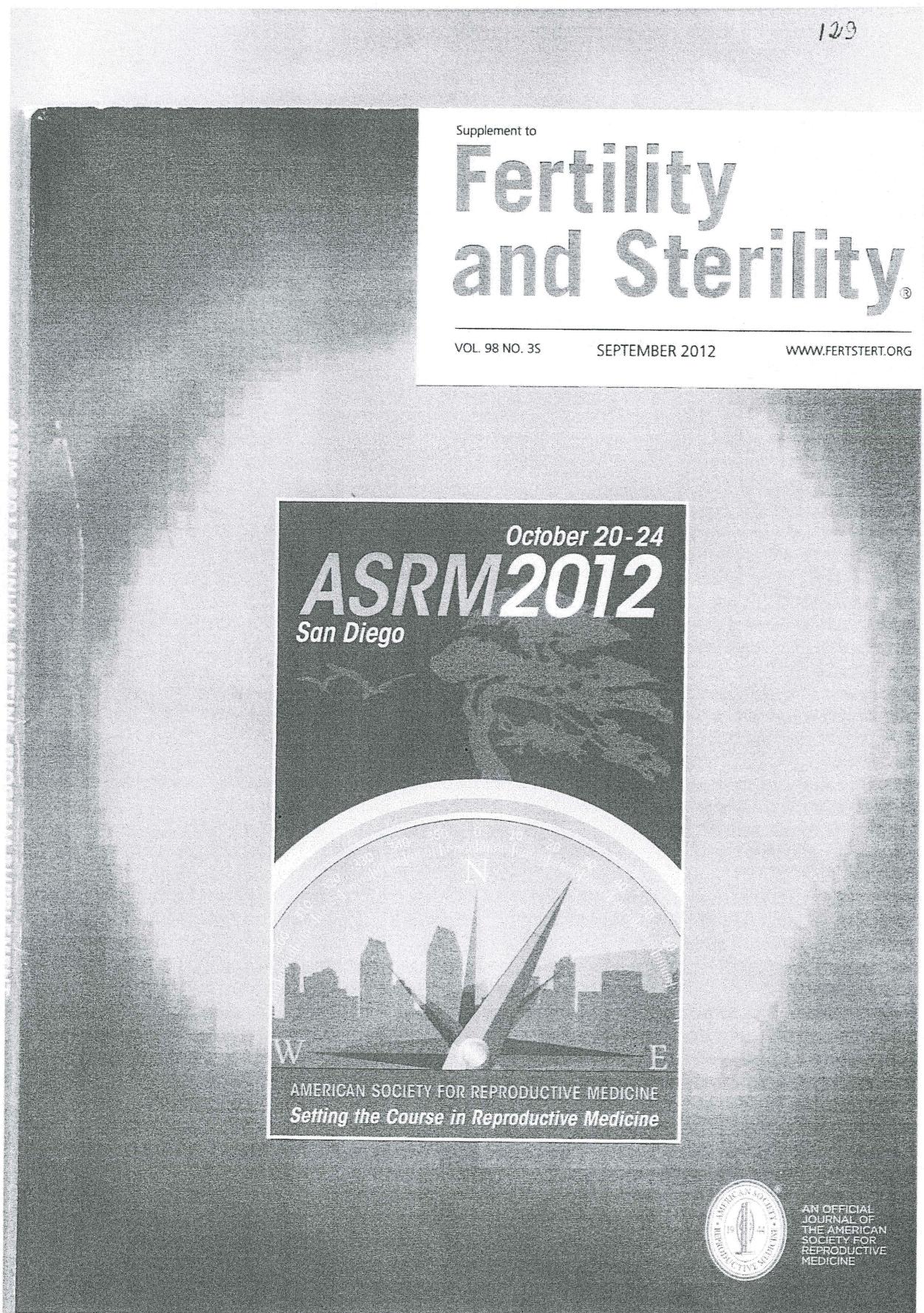


Figura 1: Blastocisto corado A- Coloração dos blastômeros corados pelo DAPI e visualizados no filtro 460nm. B- Células em apoptose identificadas pela fluoresceína através do filtro 520±20nm. C- Embrião em que a enzima do TUNEL foi omitida, não observando sinal fluorescente.

11.5 Abstract publicado na Fertility and Sterility -2012



**RESULTS:** There was no difference in percent fertilization (82% CM, 84% OHM), cleavage (82% CM, 85% OHM) or total blastocysts developed of total oocytes undergoing ICSI (53% CM, 54% OHM). However, culture for the first 24 hours in OHM increased the percentage of good quality blastocysts from total oocytes undergoing ICSI (40% CM, 46% OHM,  $P=0.08$ ) and the percentage of good quality blastocysts of total blastocysts produced (77% CM, 85% OHM,  $P=0.08$ ). We observed no difference in implantation rate (CM 14/22, 67%; OHM 6/7, 71%; mixed 14/16, 88%), or ongoing pregnancy rate (CM 8/12, 67%; OHM 4/4, 100%; mixed 7/8, 88%), although more transfers are required to definitively answer this question.

**CONCLUSION:** This study has demonstrated that use of a medium formulated specifically to meet the needs of the oocyte during retrieval, ICSI and initial culture can increase the quality of blastocysts produced and the number of transferrable blastocysts in an IVF cohort.

P-189 Tuesday, October 23, 2012

**OPTIMIZING THE TEMPERATURE FOR EMBRYO CULTURE IN IVF: A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL (RCT) COMPARING STANDARD CULTURE TEMPERATURE OF 37°C TO THE REDUCED MORE PHYSIOLOGIC TEMPERATURE OF 36°C.** K. H. Hong,<sup>a,b</sup> E. J. Forman,<sup>a,b</sup> H. Lee,<sup>a</sup> K. M. Ferry,<sup>a</sup> N. Treff,<sup>a</sup> R. Scott.<sup>a</sup> <sup>a</sup>Reproductive Endocrinology, Reproductive Medicine Associates of New Jersey, Morristown, NJ; <sup>b</sup>Obstetrics, Gynecology & Reproductive Sciences, UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical School, New Brunswick, NJ; <sup>c</sup>Genetics, Rutgers-The State University of New Jersey, Piscataway, NJ.

**OBJECTIVE:** In most modern IVF laboratories, human oocytes and embryos are cultured at 37°C - human core temperature. While intuitive, the ideal temperature for in vitro embryo culture has not been determined. In fact, studies in animal models and humans suggest that ovarian follicles and fallopian tubes are typically at least 1°C cooler than core. According to Leese's "Quiet Embryo Hypothesis", preimplantation embryos may develop optimally at a less stressful reduced metabolic rate resulting from cooler in vivo temperatures. This study seeks to determine whether in vitro culture at 36°C results in improved blastulation and ultimately implantation.

#### DESIGN: Paired RCT.

**MATERIALS AND METHODS:** Patients were  $<$  age 42 with normal ovarian reserve. After retrieval, mature metaphase II oocytes (MII) were randomized to culture at either 37°C or 36°C. All embryos were cultured to the blastocyst stage. Blasts underwent trophectoderm biopsy for aneuploidy screening and DNA fingerprinting. Developmental outcomes were compared. The study was powered to detect a 15% increase in blastulation rate ( $n=50$  cycles). After the first 10 cycles, an interim analysis was done to assure safety.

**RESULTS:** 169 MIIs have been studied (37°C  $n=86$ , 36°C  $n=83$ ). Fertilization (80% vs 86%), cleavage (96% vs 94%), and blastulation (46% vs 40%) rates were equivalent. The proportion of oocytes becoming high-quality euploid blasts was also equivalent (28% vs 27%). The only observed difference was a reduction in day 3 cell number the 36°C group consistent with the desired reduced metabolic rate ( $6.9 \pm 2.1$  vs.  $7.9 \pm 1.8$  cells,  $P<0.01$ ).

**CONCLUSION:** This RCT represents the first prospective evaluation of the optimal in vitro culture temperature for human embryos. Interim analysis finds no evidence of harm in lowering the culture temperature, so the RCT is proceeding to fully determine the impact of culture at a more physiologic level. The study is nearing completion with all data including DNA fingerprinting on the conceptuses to assess implantation rates soon to be available.

P-190 Tuesday, October 23, 2012

**GENE EXPRESSION AS BIOMARKERS OF QUALITY TO COMPARE CULTURE OF SYSTEM: SINGLE MEDIUM AND SEQUENTIAL MEDIA SYSTEM.** J. Polisseni,<sup>a,b,c</sup> F. Polisseni,<sup>b</sup> M. M. Pereira,<sup>c</sup> M. O. Guerra,<sup>a</sup> L. S. A. Camargo,<sup>c</sup> V. M. Peters.<sup>a</sup> <sup>a</sup>Center of Biology Reproduction, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil; <sup>b</sup>Assisted Reproduction, Clínica Pró-Criar/Monte Sinai, Juiz de Fora, MG, Brazil; <sup>c</sup>Animal Reproduction, Embrapa Dary Cattle, Juiz de Fora, MG, Brazil.

**OBJECTIVE:** Evaluate embryo development and gene expression (HSP70.1, PRDX, GLUT-1 and GLUT-5) of blastocysts that cultured in two different systems: single medium, and a sequential media system, utilizing bovine embryo as a model. We compared the results obtained with medium utilized in bovine embryo: CR2aa and SOF.

#### DESIGN: Prospective randomized study.

**MATERIALS AND METHODS:** 1040 cumulus oocyte-complexes were obtained from slaughterhouse ovaries, matured, and fertilized in vitro at 38.8°C with 95% humidified air and 5% CO<sub>2</sub>. After, the presumptive zygotes were semi-denuded and were distributed randomly across the groups for cultured: CR2aa ( $n=276$ ), SOF ( $n=264$ ), sequential media system: ECM/Multi-blast - Irvine® ( $n=163$ ) and single medium Global - Life Global® ( $n=284$ ). Cleavage and blastocyst rate were evaluated. Real-time PCR was used for gene expression analysis on the blastocysts. Statistical differences between treatment groups were analyzed using the Chi square test. The quantification of gene expression was analyzed with REST® as Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST®. P values  $<0.05$  were considered significant.

**RESULTS:** The evaluation of embryo development was not able to distinguish any difference of development amongst culture media from cleavage rate (72.1%, 76.1%, 74.0%, 76.4, respectively) thorough blastocyst rate (30.4%, 27.0%, 35.0% and 38.0%, respectively) in CR2aa, SOF, ECM/Multi-blast and Global, ( $P>0.05$ ). Although, Global medium produced higher ( $P<0.01$ ) expression of GLUT-1 and GLUT-5 compared with the ECM/multi-blast. But neither sequential and single medium were affect for expression of stress-responsive gene transcripts: HSP70.1 and PRDX.

**CONCLUSION:** Based on the embryo development the single media and sequential system was similar, but an expression of gene predicts that single media had a better performance because GLUTs was higher and energy metabolism plays an important role during preimplantation embryo development and could be used as biomarkers for the study embryo viability.

*Supported by:* FAPEMIG.

P-191 Tuesday, October 23, 2012

**BLASTOCYST DEVELOPMENT IN VITRO IS INFLUENCED BY COLONY STIMULATING FACTOR 3 (CSF3).** G. A. Thouas, M. Truong, N. J. Hannan, D. K. Gardner. Department of Zoology, Faculty of Science, The University of Melbourne, Melbourne, VIC, Australia.

**OBJECTIVE:** To determine the growth and differentiation effects of colony stimulating factor 3 (CSF3) on preimplantation embryo development, by testing it as a culture media supplement.

**DESIGN:** Recombinant CSF3 was added to embryo culture media designed for clinical IVF. Blastocyst development was then assessed using different mouse strains.

**MATERIALS AND METHODS:** Pronucleate oocytes were flushed from oviducts of female hybrid (B6CBAF1) mice, after ovarian stimulation and mating. Following denudation and rinsing, oocytes were cultured in precompaction medium (G1plus™) under standard conditions (37°C, 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>). After 48 hrs (Day 3) compacting embryos were then transferred to post-compaction medium (G2plus™) with 0.1-1000 ng/mL CSF3, cultured either singly (2 $\mu$ L drops) or in groups (10/20 $\mu$ L) to the blastocyst stage. At 96 hrs (Day 5) morphology and cell allocation to the inner cell mass (ICM) and trophectoderm were quantitated. The same experiment was repeated for Swiss outbred mice (1-100 ng/ml, Day 4 cultures) with the addition of time-lapse imaging. Analysis of variance and linear regression were applied to mean values.

**RESULTS:** For F1 mice, single embryo cultures with CSF3 resulted in blastocysts with increased hatching and increased cell numbers proportional to dosage, significant at 100ng/ml, a trend seen only in albumin-free media. Grouped embryos (at 100 ng/ml CSF3 & albumin) also formed blastocysts with higher cell numbers than negative controls (113 vs 102,  $P<0.001$ ) and with higher ICM numbers (30 vs 22,  $P<0.05$ ). For Swiss mice, no significant changes were seen in Day 4 blastocyst formation or cell number, although a significant increase in cavitation after 65 hours was seen (single embryo culture with CSF3 Day 3-4) compared to negative controls.

**CONCLUSION:** CSF3 appears to stimulate cell proliferation, differentiation and morpho-kinetics of blastocysts across two mouse strains. These effects may augment existing autocrine/paracrine regulatory processes.

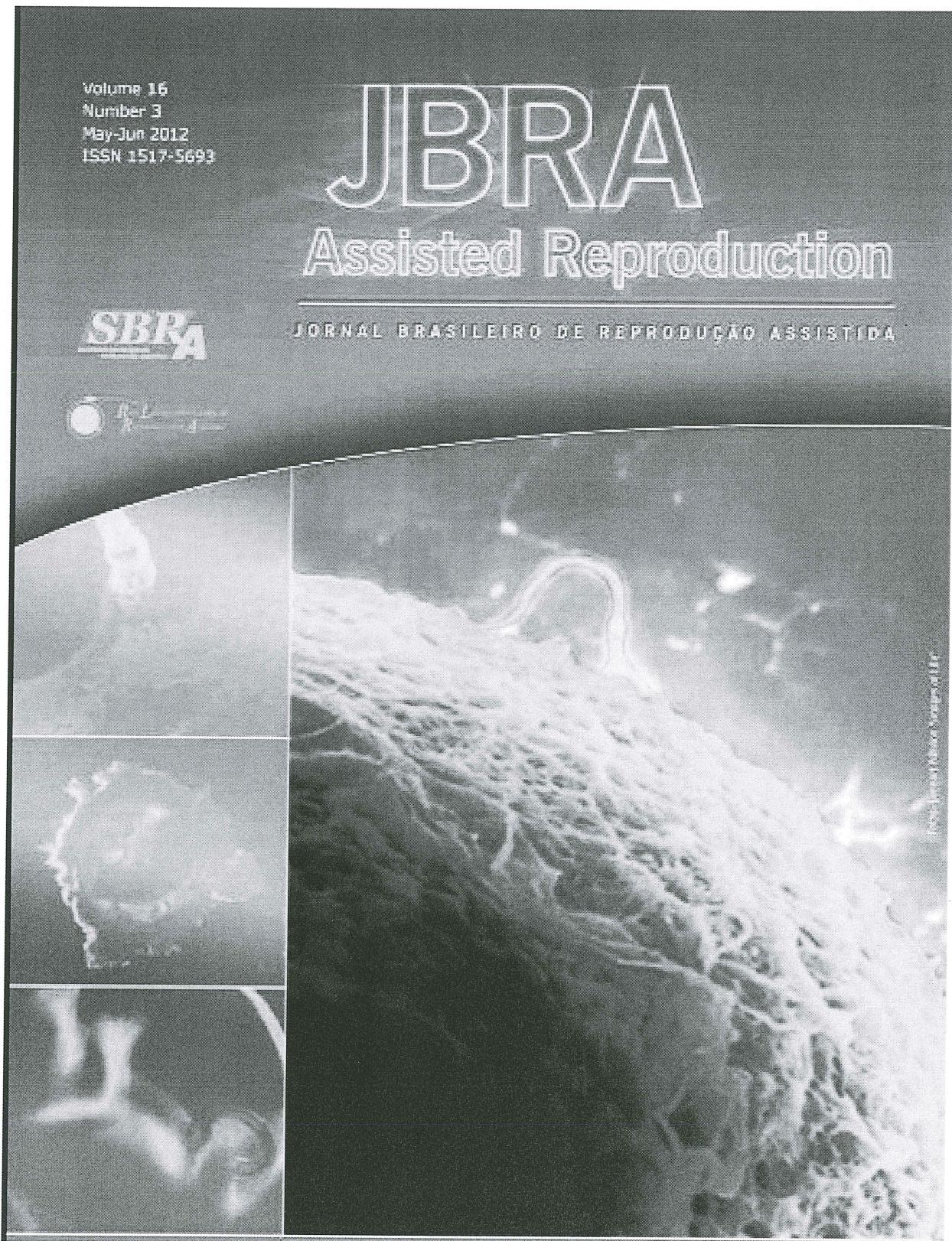
*Supported by:* Vitrolife AB and The University of Melbourne.

P-192 Tuesday, October 23, 2012

**USE OF TIMELAPSE AND KINETIC MARKERS TO COMPARE TWO DIFFERENT ONE-STEP IVF CULTURE.** T. Trinh, N. Desai, J. Goldberg. Obstetrics and Gynecology/Women's Health Institute, Cleveland Clinic, Beachwood, OH.

**OBJECTIVE:** The timings of specific cellular events may be useful kinetic markers to discern differences in embryo growth patterns. This study uses

11.6 Abstract publicado no Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida -  
2012



pacientes que se mantiveram eumenorréicas no t6mpq apresentavam níveis de HAM e CFA significativamente maiores no tzero.**CONCLUSÕES:**Todos marcadores mudaram significativamente com a ação gonadotóxica. Entretanto, a CFA foi o único marcador que não demonstrou mudança após as pacientes expostas à quimioterapia voltarem a ciclar. Assim, o HAM pode ser utilizado como marcador de reserva ovariana porque demonstra claramente queda em seus níveis, de forma mais fiel que o FSH, mesmo com ciclos menstruais regulares, porém, parece que a CFA pode ser mais fiel à RO por não sofrer modificações mesmo quando os ciclos menstruais voltam a ser regulares. CFA e HAM podem ser utilizados como preditores de gonadotoxicidade.**PALAVRAS-CHAVES:** hormônio antimülleriano, gonadotoxicidade, reserva ovariana, contagem de folículos antrais.

### **P95 - Efetividade da proteína da clara de ovo em mulheres com risco elevado para síndrome da hiperestimulação ovariana grave**

Michelon J, Badalotti M, Badalotti F, Petracco A.

Fertilitat – Centro de Medicina Reprodutiva

**OBJETIVO:** Avaliar a eficácia do uso de claras de ovos de galinha na prevenção da forma grave da Síndrome da Hiperestimulação Ovariana (SHEO) em pacientes com risco elevado para a síndrome. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Quarenta e duas mulheres com alto risco para SHEO foram submetidas a FIV com protocolo longo. Vinte e duas delas (G1) usaram medidas preventivas com albumina humana 20g no dia da transferência e/ou menor dose de hCG e/ou Bromocriptina e não transferiram os embriões, os quais foram criopreservados e transferidos em ciclos futuros. As outras 20 mulheres (G2) usaram seis claras de ovos ao dia, divididas em três tomadas, a partir do quinto dia de estimulação até o dia do teste de gravidez, sem nenhuma outra medida adicional, e todas transferiram seus embriões. Os dados foram analisados estatisticamente pelos testes Qui-Quadrado e Exacto de Fisher. **RESULTADOS:** O número médio de folículos no G1 foi 46,9 e no G2 de 47,7. A taxa de fertilização foi semelhante entre os grupos (71% e 80%, respectivamente). A taxa de gravidez clínica, quando comparado embriões criopreservados do G1 e embriões frescos de G2, foi semelhante (45,5% e 40%, respectivamente). O diâmetro ovariano médio, uma semana depois da aspiração folicular, foi semelhante entre os grupos (8,2cm no G1 e 6,9cm no G2). A necessidade de visitas médicas para acompanhamento da SHEO, depois da punção folicular, foi significativamente menor ( $p<0,001$ ) no G2 (média de 3,4 visitas no G1 e 1,3 no G2). O desenvolvimento de SHEO grave (18% dos casos) foi exclusivo no G1 ( $p=0,004$ ). Todas as mulheres do G2, mesmo aquelas que engravidaram, tiveram ausência ou, no máximo, SHEO leve. SHEO moderada ocorreu em 18% das mulheres do G1. Nenhuma reação adversa ao uso das claras de ovos foi observada. **CONCLUSÕES:** O uso profilático de claras de ovos durante a FIV mostra-se eficaz e seguro na prevenção da SHEO grave em pacientes com alto risco para desenvolver a síndrome, mesmo na ocorrência de gravidez. Secundariamente, esta medida evita a transmissão de prions ou infecções virais como hepatites e HIV, relatados com o uso da Albumina Humana.

### **P96 - Eficiência da vitrificação de embriões em haste utilizando papel filtro para remoção do excesso da solução crioprotetora**

Salvador Ra<sup>1</sup>; Frajblat M<sup>2</sup>; Amaral V L L<sup>3</sup>

<sup>1</sup>UNIVALI- Universidade do Vale do Itajaí - Itajaí/SC; <sup>2</sup>UFRJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro/RJ

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da vitrificação de embriões murinos em haste utilizando papel filtro como método para a remoção do excesso da solução crioprotetora. Embriões de camundongo no estágio de 2 células foram expostos à solução crioprotetora VI-1 (Ingámed®) por 12 minutos, sendo então transferidos para a solução VI-II (Ingámed®) e envasados em hastes de vitrificação (Vtri Ingá, Ingámed®). O excesso da solução crioprotetora foi removido por dois métodos: 1) com o auxílio de pipeta Pasteur de vidro estirada (grupo controle) e 2) com pequenas tiras de papel filtro estéril (grupo teste). As hastes foram então submersas em nitrogênio líquido. O tempo decorrido entre a exposição à solução VI-II e a imersão no nitrogênio líquido não excedeu 60 segundos. O aquecimento dos embriões foi realizado mergulhando as hastes diretamente em solução DV-I (Ingámed®) onde permaneceram por 1 minuto antes de serem transferidos para a solução DV-II (Ingámed®). Após 3 minutos foram lavados 2 vezes na solução DV-III( Ingámed®), por 5 minutos cada. Os embriões foram cultivados em placas de poliestireno (15x35mm, Ingámed®), em gotas de 30µL de meio (Global - Lifeglobal®, suplementado com SSS -Irvine Scientific®), cobertas com óleo mineral e previamente gaseificadas. O cultivo foi realizado em incubadora Thermo modelo 3110, com temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O desenvolvimento embrionário foi avaliado até o estágio de blastocisto expandido e os resultados analisados pelo teste  $\chi^2$  (chi-quadrado). Não foram observadas diferenças nas taxas de blastocisto expandido entre os grupos teste (93%) e controle (89%). Os resultados deste estudo sugerem que a utilização de tiras de papel filtro pode ser empregada na remoção do excesso da solução crioprotetora sem alterações dos resultados da técnica de vitrificação em haste.

### **P97 - Utilização de genes biomarcadores para avaliação da qualidade de embriões cultivados em sistema de cultivo sequencial e único**

Polisseni, J<sup>1,2,3</sup>; Polisseni, F<sup>3</sup>; Munck, Mp<sup>2</sup>; Guerra, Mo<sup>1</sup>; Camargo, Lsa<sup>2</sup>; Peters, Vm<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biologia da Reprodução – Uffj; <sup>2</sup>Embrapa Gado de Leite; <sup>3</sup>Clinica Pró-Criar/Monte Sinai

**OBJETIVO:** Comparar os sistemas de cultivo único e sequencial através da avaliação do desenvolvimento embrionário e expressão dos genes facilitadores do transporte de glicose 1 e 5 (Glut-1 e Glut-5) e relacionados ao estresse celular (Hspa 70.1 e Prdx), utilizando embrião bovino como modelo experimental. **METODOLOGIA:** Complexos cumulus-oócitos ( $n=1040$ ) foram obtidos de ovários de matadouro, maturados e fertilizados *in vitro*. Os

zigotos obtidos foram semi-desnudados e distribuídos, aleatoriamente, entre os grupos de cultivo CR2aa ( $n = 276$ ), SOF ( $n = 264$ ) (meios conhecidos no cultivo de embriões bovinos), sistema de cultivo seqüencial: ECM / Multiblast - Irvine® ( $n = 163$ ) e sistema de cultivo único: Global - Life Global® ( $n = 284$ ). As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas. Utilizou-se PCR em tempo real para análise da expressão dos genes nos blastocistos. As diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento foram analisados pelo teste qui-quadrado. A quantificação da expressão dos genes foi avaliada pelo software Relative Expression Software Tool (REST®) através do Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST®. Valores  $p < 0,05$  foram considerados significativos. **RESULTADOS:** Não ocorreu diferença ( $P > 0,05$ ) na taxa de clivagem entre os grupos (72,1%, 76,1%, 74,0%, 76,4%, respectivamente para CR2aa, SOF, meio seqüencial ECM/Multiblast®, e meio único Global®). Também não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na produção de blastocisto entre os grupos (30,4%, 27,0%, 35,0% e 38,0%), no oitavo dia de cultivo. Entretanto houve diferença na expressão dos genes importantes no desenvolvimento embrionário. Os sistemas de cultivo único e seqüencial, quando comparados entre si, não foram influenciados pela expressão de transcritos de genes em resposta ao estresse: Hsp70.1 e Prdx. Já o Glut-1 e o Glut-5 apresentaram uma maior expressão de transcritos ( $P < 0,05$ ) no sistema único de cultivo, sugerindo a melhor qualidade dos embriões neste sistema, quando comparado com o sistema de cultivo seqüencial. **CONCLUSÃO:** Em relação ao desenvolvimento embrionário, os sistemas de cultivo foram semelhantes. De acordo com a expressão genética, o sistema de cultivo único apresentou-se superior, pois os gluts são moléculas reguladoras do desenvolvimento embrionário. Eles poderiam ser utilizados como biomarcadores para o estudar a viabilidade do embrião.

### P98 - Aspécitos bioéticos sobre o destino dos embriões criopreservados nas clínicas de reprodução

Girlene Celestina de Jesus, Lucialda Dias Lopes Chaves, Marcelle Reis Miranda, Paulo Franco Taitson

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - PUC Minas.

**OBJETIVO:** Perceber aspectos bioéticos em relação ao destino de embriões criopreservados na literatura internacional. **MATERIAL E MÉTODOS:** Pesquisa exploratória tendo como fonte de consulta, pesquisa na base de dados do MEDLINE. Os descriptores selecionados foram: Unused embryos and bioethics, bioethics and assisted reproduction. Período da pesquisa: Publicações de 2000 à 2010. **RESULTADOS:** A partir desta busca, foram encontrados 115 artigos. Os dados mostraram que em 93,91% dos estudos existe uma preocupação real por parte dos pesquisadores quanto ao destino dos embriões congelados. No entanto, é discutível o que fazer com estes embriões. Nos estudos envolvidos, a preocupação ética esteve presente tanto para médicos, biólogos e enfermeiros. **CONCLUSÃO:** É notória a preocupação dos pesquisadores sobre o destino dos embriões congelados em clínicas de reprodução humana. Atualmente sabe-se que o Brasil é um dos países com o maior número de embriões nestas condições. Com a Lei nº 8.974, a Lei de Biossegurança

e a Resolução nº 1358 da ANVISA, mostra-se premente uma mudança de postura no Brasil quanto a necessidade e a responsabilidade de se congelar embriões.

### P99 - Início tardio da gravidez. Tendência atual das mulheres?

Danielle Miranda Barbosa, Samara Lima de Oliveira, Cristiane Neiva Carvalho Dilly, Ana Paula Lopes Dumont Amormino, Paulo Franco Taitson

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - PUC Minas

**OBJETIVOS:** Discutir o aumento da média de idade das mulheres que procuram tratamento de infertilidade. **MATERIAL E MÉTODOS:** Trata-se de uma pesquisa na base de dados do MEDLINE, no período de 2002 a 2010 com os seguintes descriptores: assisted reproduction, age and assisted reproduction.

**RESULTADOS:** Foram encontrados 36 artigos que definiram o horizonte de estudo. A idade da mulher e as possíveis alterações fetais decorrentes deste quesito foram evidentes em 97% dos estudos. **CONCLUSÃO:** Mesmo reconhecendo a possibilidades de alterações morfológicas fetais e gravidez de risco após os 40 anos, torna-se preocupante observar que cada vez mais as mulheres tem retardado a gravidez. Independência financeira, realização profissional e casamento tardio são os principais indicadores.

### P100 - A bioética e o diagnóstico genético pré-implantacional (PGD)

Grazielle A. Silva Rodrigues, Isabela Pereira Silva, Joyce de Carvalho Xavier, Nívea Evangelista Rocha, Paulo Franco Taitson

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - PUC Minas

**OBJETIVOS:** Na atualidade, os casais vivem o seguinte paradigma: prosseguir com o tratamento da infertilidade conjugal mesmo após descobrir através do Diagnóstico Genético pré-implantacional que embriões provenientes da reprodução assistida tem alguma anomalia genética ou optar por não levar adiante o tratamento. **MATERIAL E MÉTODOS:** Trata-se de uma busca na base de dados do MEDLINE, no período de 2004 a 2011 com os seguintes descriptores: assisted reproduction, preimplantation genetic diagnosis and bioethics. **RESULTADOS:** Foram selecionados 64 artigos para o estudo. Em 92,18% dos estudos observou-se a dificuldade dos casais em definir se levam adiante o tratamento da infertilidade. Quanto mais velho era o casal e maior o tempo de infertilidade, a dúvida mostrou-se mais evidente (95%). **CONCLUSÃO:** Existiu ainda uma dificuldade substancial dos casais em reconhecer o Diagnóstico Genético Pré-Implantacional como uma técnica éticamente aceitável.

### P101 - Atuação do enfermeiro na prevenção da síndrome de hiperestimulação ovariana

Thiago dos Santos Pimenta, Darlene B. Lamim, Natália Costa Laurindo, Ana Paula Sousa, Paulo Franco Taitson

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - PUC Minas.