

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**CULTIVO *IN VITRO* EM *WELL-OF-THE-WELL* DE EMBRIÕES QUIMERAS DE  
*Mus musculus domesticus***

**Autor: Lis Santos Marques**

**Nº do cartão: 150291**

**PORTO ALEGRE**

**2012/1**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**CULTIVO *IN VITRO* EM *WELL-OF-THE-WELL* DE EMBRIÕES QUIMERAS DE  
*Mus musculus domesticus***

Autor: Lis Santos Marques

Nº do cartão: 150291

Monografia apresentada à  
Faculdade de Veterinária como  
requisito parcial para obtenção  
da Graduação em Medicina  
Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues

**PORTO ALEGRE**

**2012/1**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Wilmar e Ieda, e ao meu irmão, Gabriel, por compreenderem minha ausência em determinados momentos ao longo desses últimos anos e sempre estarem ao meu lado permitindo que este sonho se realizasse.

A toda a minha família, em especial o meu tio Air e o meu avô Ary (in memorian) ` verdadeiros responsáveis por eu ter escolhido a Medicina Veterinária como profissão.

Aos meus queridos amigos, Luciane Zeilmann, Nathália Vargas, Charlie Lemes e Davi Valar, por serem mais do que amigos, me fazendo sorrir nos momentos difíceis e dar gostosas gargalhadas nos momentos de descontração.

As minhas queridas amigas Andrea Giannotti Galuppo, Eliana Franco Lopes e Zilah Maria Gervasio Cheuiche, as quais me ensinaram a trabalhar em grupo com humildade e amizade acima de tudo.

A toda equipe do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da UFRGS, em especial os estagiários, amigos e colegas, Nicole Louise Lângaro Amaral, Régis Linhares Oliveira, Otávio Pires Sicco, Bruna Rodrigues Willhelm, Rajla Hutsulka Simonetti e Priscilla Deluchi, pessoas que me ajudaram muito durante o período em que fui bolsista de iniciação científica.

Ao Prof. Dr. José Luiz Rodrigues pela orientação, amizade e confiança, mas acima de tudo por acreditar no meu potencial e me proporcionar as oportunidades que me fizeram crescer profissionalmente.

A Profa. Dra. Marcia Bohrer Mentz pela orientação e aprendizado durante o período em que eu fui bolsista de monitoria na disciplina de Parasitologia, e pela amizade, paciência e carinho nos momentos mais difíceis em que passei durante a faculdade.

A Profa. Dra. Sueli Hoff Reckziegel sempre atenciosa e disposta a ajudar.

Aos meus amigos e colegas, Alana, Cíntia, Daihana, Mariane e Eduardo, amizades estabelecidas durante este período de faculdade que certamente levarei comigo para o resto da vida.

Agradeço a todas as dificuldades que enfrentei, pois se não fossem elas eu não teria saído do lugar.

Agradeço a Deus pela oportunidade de mais uma conquista.

## EPÍGRAFE

*“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.”*

Chico Xavier

## RESUMO

O desenvolvimento *in vitro* de quimeras a partir da agregação de diferentes massas celulares embrionárias, produzindo um único indivíduo com duas ou mais linhagens celulares, é uma técnica que pode ser empregada na produção de clones. O experimento teve como objetivo comparar a eficiência do cultivo *in vitro* (CIV) de quimeras pelo sistema *Well-of-the-Well* (WOW) modificado por Feltrin *et al.* (2006) com o sistema de microgotas (PEURA *et al.*, 1998). Fêmeas da espécie *Mus musculos domesticus*, da linhagem CF1 suíça Albina, foram induzidas à superovulação e após acasaladas com machos inteiros. Quarenta e oito horas após a observação do tampão vaginal foi realizada a coleta dos embriões nos estádios de quatro, oito e 16 células. Os embriões, com exceção do grupo controle, foram expostos a enzima pronase 26 UI/mL diluída em PBSm, para a remoção da zona pelúcida (ZP). O CIV foi realizado em meio KSOM suplementado com 0,4% de BSA, durante 72 h. No Grupo 1 (G1) pares de embriões (n= 67 pares) sem ZP foram cultivados em microgotas de 10 µL de meio; no Grupo 2 (G2) pares de embriões (n= 69 pares) sem ZP foram submetidos ao CIV pelo sistema WOW modificado, no qual os micropoços foram produzidos manualmente dentro de poços de placas de quatro poços contendo 500 µL de meio; finalmente dez embriões em média por replicação do grupo controle (GC), com a zona pelúcida intacta, foram cultivados em gotas de 100 µL de meio. Os resultados de seis replicações foram analisados aplicando-se o teste do  $\chi^2$ , para  $P < 0,05$ . Os dados revelaram diferença significativa entre os grupos 1 e 2 nas taxas de agregação de massas celulares: G1= 58% (39/67) e G2= 83% (57/69). As taxas de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto apresentaram diferenças significativas entre os três grupos: G1= 43% (29/67), G2= 66% (46/69) e GC= 92% (55/60). O sistema de cultivo WOW modificado é mais eficiente para a produção *in vitro* de quimeras de embriões *Mus musculos domesticus* que o cultivo em microgotas.

**Palavras-chave:** quimeras, embriões murinos, *Well-of-the-Well* (WOW), microgotas, cultivo *in vitro* (CIV).

## **ABSTRACT**

The *in vitro* development of aggregates embryos (chimeras) of different embryonic cell masses, producing just one individual with two or more cell lines is a technique that can be used to improve mammalian clone production. Thus, this experiment was design to compare the efficiency of *Mus musculus domesticus* embryo chimeras production by *in vitro* culture (IVC) using the Well-of-the-Well (WOW) modified system (FELTRIN *et al.*, 2006) with the system of microdroplets (PEURA *et al.*, 1998). Mice females, strain CF1 Swiss Albino were induced to superovulation and mated with fertile males. The embryos at development stages of 4, 8 and 16 cell were collected 48 h after vaginal plug observation. The embryos of experimental groups were first exposed to the enzyme pronase (26 UI/mL PBSm), to remove the zona pellucida (ZP), and then transferred to KSOM medium supplemented with 0,4% BSA under mineral oil, in a humid gaseous atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C during 72 h for IVC. Group 1 (G1): embryos pairs (n= 67) without ZP were cultured in microdroplets of 10 µL of medium; Group 2 (G2): embryos pairs (n= 69) without ZP were cultured in WOW modified system, which manually produced microwells, using four wells plates containing 500 µL of medium; Control group (CG): embryos (average of 10 per replication) with intact zona pellucida were cultivated in drops of 100 µL of medium. The results of six replicates were analyzed by  $\chi^2$  test (P <0.05). The rates of cellular masses aggregation shows a significant difference between G1= 58% (39/67) and G2= 83% (57/69). The embryo development rates to the blastocyst stage differ significantly among the three groups: G1= 43% (29/67), G2= 66% (46/69) and GC= 92% (55/60). The WOW modified embryo culture system is more efficient to produce *in vitro* mice chimeras than the microdroplets system.

**Keywords:** Chimeras, murine embryos, Well-of-the-Well (WOW), microwells, in vitro culture (IVC).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ação da enzima pronase para remoção da zona pelúcida.....	16
Figura 2 - (A) Visão geral do sistema de cultivo em microgotas. (B) No detalhe, blastocisto quimera no centro da gota de 10 $\mu$ L de meio.....	17
Figura 3 - (A) Visão geral do sistema WOW ( <i>Well-of-the-well</i> ) modificado. (B) Blastocisto quimera após 72 h de CIV removido do micropoço para avaliação...	17

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxas de agregação de massas celulares e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto eclodido <i>in vitro</i> de quimeras de <i>Mus musculus domesticus</i> .....	18
Tabela 2 - Taxa de agregação das massas celulares e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto <i>in vitro</i> de quimeras de embriões de quatro, oito e 16 células de <i>Mus musculus domesticus</i> cultivados <i>in vitro</i> .....	19



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**%**: porcentagem

**°C**: graus celsius

**μL**: microlitro(s)

**μm**: micrometro (s)

**μL**: microlitro (s)

**mL**: mililitro (s)

**BSA**: albumina sérica bovina (bovine serum albumin)

**CF1**: linhagem de camundongos

**CIV**: cultivo *in vitro*

**CO<sub>2</sub>**: dióxido de carbono

**DNA**: ácido desoxiribonucleico

**eCG**: gonadotrofina coriônica eqüina (equine chorionic gonadotropin)

**ES**: células tronco embrionárias (embryonic stem cells)

**h**: hora (s)

**hCG**: gonadotrofina coriônica humana (human chorionic gonadotropin)

**HMC**: *handmade cloning*

**ICM**: massa celular interna (*inner cell mass*)

**KSOM**: *higher K<sup>+</sup> simplex optimization medium*

**PBSm**: solução salina fosfatada tamponada modificada (*modified phosphate buffered saline*)

**UI**: unidade internacional

**WOW**: *well-of-the-well*

**ZP**: zona pelúcida

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Quimera</b> .....	13
<b>2.2</b>	<b>Sistema de cultivo em <i>Well-of-the-Well</i> (WOW)</b> .....	14
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
<b>3.1</b>	<b>Água e Reagentes</b> .....	15
<b>3.2</b>	<b>Superovulação das Camundongas</b> .....	15
<b>3.3</b>	<b>Coleta e Seleção dos Embriões</b> .....	15
<b>3.4</b>	<b>Digestão da Zona Pelúcida</b> .....	16
<b>3.5</b>	<b>Cultivo <i>in vitro</i></b> .....	16
<b>3.6</b>	<b>Preparação de Micropoços do Sistema WOW modificado</b> .....	17
<b>3.7</b>	<b>Análise de Dados</b> .....	17
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	18
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	20
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	22
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	23
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24

## 1 INTRODUÇÃO

Após o nascimento da ovelha Dolly (WILMUT *et al.*, 1997) a produção de clones bovinos vem sendo realizada com diferentes objetivos e baixa eficiência por inúmeros grupos de pesquisa (KATO *et al.*, 1998; CIBELLI *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2007; GERGER *et al.*, 2010). Aliado aos modelos de clonagem, a produção de mamíferos transgênicos também alcançou um considerável desenvolvimento nos últimos anos (KEEFER *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 2007). O interesse em se produzir fármacos através de proteínas animais aproximou os dois modelos experimentais, com o objetivo da seleção de animais transgênicos que expressam genes responsáveis por estas proteínas de interesse da saúde humana (BAGUISI *et al.*, 1999; SALAMONE *et al.*, 2006). Uma das barreiras a serem transpostas é a transmissão destes genes, por herança Mendeliana, para os descendentes dos transgênicos produzidos com o auxílio das biotécnicas de reprodução (PESQUEIRO *et al.*, 2002). Uma das possibilidades de transpor a barreira da transmissibilidade da expressão gênica é clonar as fêmeas que expressam de forma rentável os genes incorporados ao genoma. Em 1997, um ano após o nascimento da ovelha Dolly, nasceu Polly, o primeiro mamífero transgênico produzido por transferência nuclear (WILMUT *et al.*, 2000). A ovelha Polly foi produzida a partir de fibroblastos fetais transfectados com o gene do fator IX de coagulação humano (SCHNIEKE *et al.*, 1997). Assim, a transferência nuclear pode ser considerada uma ferramenta para a produção de animais transgênicos (CAMPBELL, 2007). Diferentes experimentos resultaram em sucesso na produção de animais transgênicos, como os suínos (POLEJAEVA e CAMPBELL, 2000), os bovinos (KUROIWA *et al.*, 2002), os camundongos (LEE *et al.*, 2007), os caprinos (JIA *et al.*, 2008) e o búfalo (HUANG *et al.*, 2010). Peura *et al.* (1998) e Vajta *et al.* (2001, 2002) desenvolveram a técnica de *handmade cloning* (HMC), que possibilitou uma simplificação da rotina de micromanipulação, proporcionando novas perspectivas para a produção de animais transgênicos. Como os embriões produzidos por HMC são desprovidos

de zona pelúcida, o cultivo em grupo na forma tradicional, isto é, em microgotas de 100 µL, torna-se inviável, resultando numa ineficiente agregação e compactação embrionária (VAJTA *et al.*, 2005). Assim, grupos de pesquisas vêm desenvolvendo novos sistemas de cultivo (CIV), objetivando o cultivo individual dos embriões, como o cultivo em microgotas, proposto por Peura *et al.*, (1998) e o sistema de *Well-of-the-Well* (WOW), descrito por Vajta *et al.* (2000) e modificado por Feltrin *et al.* (2006). A produção de quimeras constitui-se em um modelo adequado para o emprego no âmbito das duas biotécnicas de reprodução assistida, como a produção de clones e a de animais transgênicos. O objetivo do experimento foi comparar a eficiência do emprego do WOW modificado (FELTRIN *et al.*, 2006) e das microgotas (PEURA *et al.*, 1998) na produção de quimeras de *Mus musculus domesticus*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Quimera

A quimera na mitologia é uma figura mística caracterizada por uma aparência híbrida de dois ou mais animais, porém este termo atualmente é utilizado para descrever uma técnica de produção de indivíduos mistos, ou seja, com origem embrionária geneticamente combinadas. No entanto, atualmente usa-se muito o termo transgênico que se refere a animais ou organismos cujo patrimônio genético foi alterado artificialmente pela introdução, modificação ou deleção de uma seqüência de DNA no seu genoma, incluindo a linhagem de células germinativas, de modo que essa alteração seja transferida aos seus descendentes (PESQUEIRO *et al.*, 2002).

Os pioneiros na produção de embriões quimeras foram Tarkowski (1961); Mintz (1962), os quais demonstraram que através da agregação de zigotos de duas ou mais células poderiam se produzir um indivíduo normal. Os tecidos deste animal eram uma mistura de células oriundas de dois diferentes embriões. A produção de quimeras através da técnica de microinjeção intracitoplasmática foi desenvolvida por Gardner (1968), na qual células exógenas eram injetadas na cavidade de blastocistos, sendo incorporadas a massa celular interna (ICM).

Diferentes tipos de células têm sido utilizados na produção de quimeras, como as células da ICM (GARDNER, 1968), as células de teratocarcinoma (MINTZ; ILLMENSEE, 1975), as células tronco embrionárias (BRADLEY *et al.*, 1984), as células germinativas embrionárias (MATSUI *et al.*, 1992), assim como as células pluripotentes geradas por transferência nuclear de células somáticas (WAKAYAMA *et al.*, 2001).

O termo transgênico foi utilizado pela primeira vez por Gordon; Ruddle (1981), em um experimento no qual através da microinjeção DNA exógeno em zigotos murinos foram produzidos camundongos geneticamente modificados.

Outras duas técnicas principais foram desenvolvidas na produção de animais transgênicos, a utilização de um retrovírus como veículo de transmissão de fragmentos de DNA exógeno (JAENISCH, 1976) e a transferência gênica em ES (GOSSLER *et al.*, 1986).

Células tronco embrionárias (ES) são linhagens obtidas da massa celular interna de embriões nos estádios iniciais de mórula ou blastocisto. Essas células são pluripotentes, ou seja, elas podem se diferenciar em todos os tipos de tecidos, incluindo as células germinativas (RALSTON; ROSSANT, 2010).

Atualmente fala-se em animais quiméricos ou mosaicos para transgene os quais são resultado da transfecção de DNA exógeno em células ES que são introduzidas em embriões. No entanto, quimeras não são apenas uma ferramenta para se produzir animais mutantes, as aplicações da tecnologia transgênica são inúmeras e em vários campos de atuação além de serem fundamentais para se estudar os efeitos biológicos de alterações genéticas (TAM; ROSSANT, 2003).

## **2.2 Sistema de cultivo em *Well-of-the-Well* (WOW)**

O sistema de cultivo *Well-of-the-Well* (WOW) proposto por Vajta *et al.* (2000) tinha como objetivo individualizar os embriões em um microambiente restrito no qual os fatores produzidos por um embrião poderiam ser compartilhados com os outros. Os resultados obtidos por Vajta *et al.* (2008) indicam que o sistema WOW é uma alternativa promissora na produção de embriões bovinos, suínos e humanos.

Feltrin *et al.* (2006) realizou modificações no sistema WOW convencional, através de mudanças na forma e no tamanho dos micropoços de cultivo. O micropoço passou de convexo para côncavo e o diâmetro foi reduzido de 280  $\mu\text{m}$  para 130  $\mu\text{m}$ . Essas alterações resultaram em um aumento significativo nas taxas de blastocisto no sétimo dia de desenvolvimento.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Água e Reagentes**

A água utilizada para a preparação de todos os meios de cultivo era estéril, obtida por ultrafiltração através do equipamento de purificação de água Milli-Q Synthesis (Millipore® Bedford, MA, EUA), com operação e manutenção conforme especificações do fabricante.

Os reagentes utilizados eram provenientes da Sigma Chemical Co (St Louis, MO, EUA), as exceções estão indicadas no texto.

#### **3.2 Superovulação das Camundongas**

Trinta e oito fêmeas adultas entre seis e oito semanas de idade e dez machos férteis entre dois e dez meses de idade da espécie *Mus musculos domesticus*, da linhagem CF1 suíça albina, foram utilizados no experimento. Os animais foram mantidos sob condições controladas de iluminação diária de 14h, temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e alimentação *ad libitum*, com ração peletizada e água.

As fêmeas foram induzidas a superovulação mediante a aplicação intraperitoneal de 10 UI de gonadotropina coriônica eqüina (eCG - Folligon®, Intervet), e 46 h mais tarde de 10 UI de gonadotropina coriônica humana (hCG - Chorulon®, Intervet), quando foram colocadas individualmente com os machos para realização da cópula. Na manhã do dia seguinte (dia um de prenhez), a constatação do acasalamento foi detectada pela presença do tampão vaginal.

#### **3.3 Coleta e Seleção dos Embriões**

Na manhã do dia três de prenhez, as doadoras de embriões foram sacrificadas por deslocamento cervical e os ovidutos foram removidos através de duas incisões, uma na bursa ovárica e outra no corno uterino. As estruturas embrionárias de cada fêmea foram recuperadas sob lupa estereomicroscópica, com luz incidente e magnitude de 10X, por perfusão através do lúmen do oviduto de 0,5 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBSm; WHITTINGHAM, 1971) acrescida de 0,4% de BSA.

As estruturas recolhidas de cada doadora foram contadas e selecionadas. Na seleção morfológica, foram considerados embriões com potencial de desenvolvimento aqueles que apresentavam contorno regular e simétrico, zona pelúcida intacta, blastômeros com

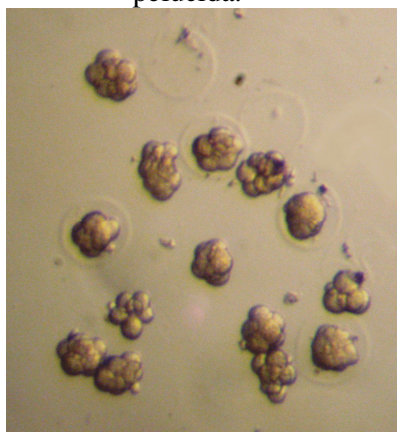
citoplasma de cor e aspecto homogêneo e ausência de fragmentação, de acordo com Baptista *et al.* (2004).

O pool de embriões viáveis nos estádios de quatro, oito e 16 células de cada fêmea foi dividido aleatoriamente em um grupo controle e dois grupos experimentais.

### 3.4 Digestão da Zona Pelúcida

Para remoção da zona pelúcida (ZP), os embriões, com exceção do grupo controle, foram expostos ao PBSm suplementado com 26 UI/mL de pronase, sendo que o tempo necessário para a remoção foi controlado visualmente, com uma variação de 60 a 90 s (Figura 1). Após a digestão, os embriões foram lavados três vezes em gotas de 100  $\mu$ L de PBSm suplementado com 0,4% de BSA.

Figura 1 - Ação da enzima pronase para remoção da zona pelúcida.



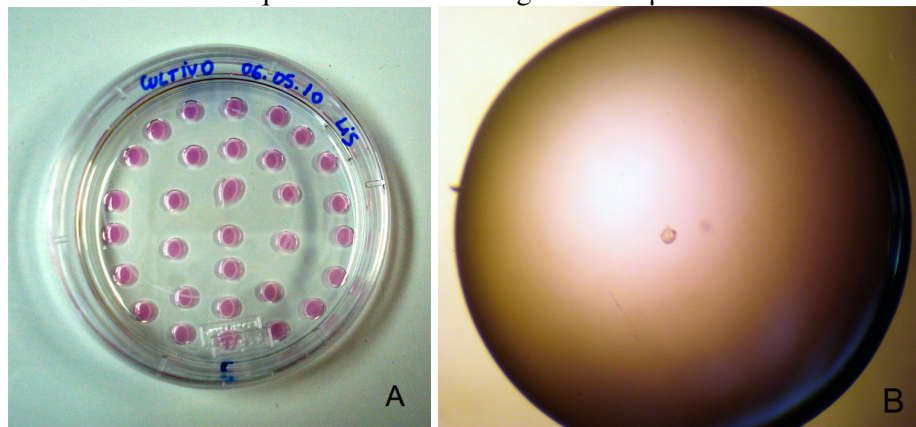
### 3.5 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* (CIV) foi realizado em meio KSOM suplementado com 0,4% de BSA, sob óleo mineral, em atmosfera gasosa de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, com umidade relativa saturada e à temperatura de 37°C, durante 72 h.

No Grupo 1 (G1) 67 pares de embriões sem ZP foram cultivados em microgotas de 10 $\mu$ L de meio (Figura 2); no Grupo 2 (G2) 69 pares de embriões sem ZP foram submetidos ao CIV pelo sistema WOW, em poços contendo 500  $\mu$ L de meio. No grupo controle dez embriões em média por replicação do grupo controle (GC), com a zona pelúcida intacta, foram cultivados em gotas de 100  $\mu$ L de meio.



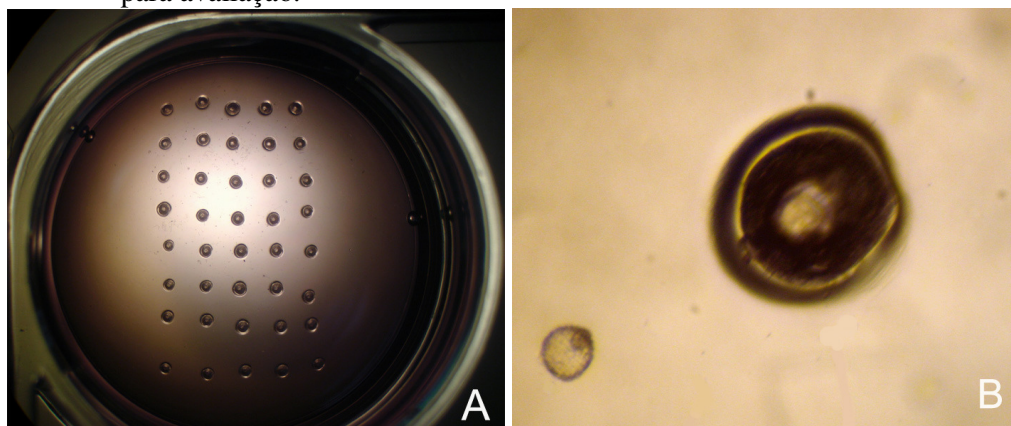
Figura 2 - (A) Visão geral do sistema de cultivo em microgotas. (B) No detalhe, blastocisto quimera no centro da gota de 10  $\mu$ L de meio.



### 3.6 Preparação de Micropoços do Sistema WOW modificado

Os micropoços do sistema WOW modificado (Figura 3) foram confeccionados com a utilização de mini brocas metálicas, em placas de quatro poços (Nunc®, Roskilde, Dinamarca), contendo 500  $\mu$ L de meio KSOM suplementado com 0,4% de BSA, cobertos com óleo mineral.

Figura 3 - (A) Visão geral do sistema WOW (*Well-of-the-well*) modificado. (B) Blastocisto quimera após 72 h de CIV removido do micropoço para avaliação.



### 3.7 Análise dos Dados

Os dados de seis replicações foram comparados entre os grupos pelo teste do  $\chi^2$ , utilizando-se  $P < 0,05$ . As taxas de agregação foram avaliadas juntamente com as taxas de blastocisto após 72 h do início do CIV. As taxas de eclosão embrionária obtidas do grupo controle também foram analisadas aplicando-se o mesmo teste.

#### 4 RESULTADOS

Das 38 fêmeas superovuladas, 34 foram coletadas e proporcionaram a recuperação de 602 estruturas, destas, 332 (55%) foram selecionadas como viáveis e divididas nos três grupos experimentais.

Os dados revelaram diferença significativa entre os grupos WOW modificado e microgotas nas taxas de agregação de massas celulares, e as taxas de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto apresentaram diferenças significativas entre os três grupos (Tabela 1). Os dados na Tabela 1 referentes ao grupo controle demonstram que o experimento foi realizado em boas condições de cultivo, uma vez que, se obteve 92% de blastocisto e que destes 80% eclodiram.

Tabela 1: Taxas de agregação de massas celulares e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto eclodido *in vitro* de quimeras de *Mus musculus domesticus*

Grupos	Embriões cultivados *(N)	Agregação das massas celulares		Taxa de blastocistos		Taxa de blastocisto eclodido	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
WOW modificado	69 (pares)	57 <sup>a</sup>	83	46 <sup>a</sup>	67	-	-
Microgotas	67 (pares)	39 <sup>b</sup>	58	29 <sup>b</sup>	43	-	-
Controle	60	-	-	55 <sup>c</sup>	92	48	80

\* Valores de 6 replicações

a,b,c números com letras desiguais na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ), pelo teste do  $\chi^2$ .

A Tabela 2 apresenta os resultados da taxa de agregação das massas embrionárias e da taxa de blastocisto levando-se em consideração os diferentes estádios celulares em que os pares de embriões foram justapostos, havendo diferença significativa entre os embriões de quatro células quando comparados com os de oito e 16 células. No entanto, não houve diferença significativa na taxa de agregação das massas celulares nem na taxa de blastocisto entre os pares de embriões cultivados nos estágios de oito e 16 células.

Tabela 2: Taxa de agregação das massas celulares e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto *in vitro* de quimeras de embriões de quatro, oito e 16 células de *Mus musculus domesticus* cultivados *in vitro*

Sistema de Cultivo	Estágio embrionário	Embriões cultivados *(N)	Agregação das massas celulares		Taxa de blastocisto	
			N	(%)	N	(%)
WOW modificado	4 células	14 (pares)	7 <sup>a</sup>	50	3 <sup>a</sup>	21
	8 células	23 (pares)	20 <sup>b</sup>	87	16 <sup>b</sup>	70
	16 células	32 (pares)	30 <sup>b</sup>	94	27 <sup>b</sup>	84
Microgotas	4 células	11 (pares)	1 <sup>a</sup>	9	0 <sup>a</sup>	0
	8 células	23 (pares)	13 <sup>b</sup>	56	10 <sup>b</sup>	43
	16 células	33 (pares)	25 <sup>b</sup>	76	19 <sup>b</sup>	58

\* Valores de seis replicações

a,b números com letras desiguais na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ), pelo teste do  $\chi^2$ .

## 5 DISCUSSÃO

Para produzirem-se embriões quiméricos, faz-se necessário o cultivo individual dos embriões, bem como ocorre na produção de clones por *handmade cloning* (HMC) e nos sistemas de cultivo de embriões humanos, no qual o desenvolvimento de cada embrião é avaliado de modo individual. De acordo com Krisher e Wheeler (2010), o cultivo individualizado durante todo o período de cultivo *in vitro* (CIV), permite avaliar a qualidade específica de cada embrião, podendo resultar em maiores taxas de prenhez.

A composição do meio e as condições de CIV afetam os embriões quiméricos, uma vez que esses são cultivados nos mesmos protocolos padrões de CIV para embriões com zona pelúcida (ZP). Porém, para que ocorra a agregação embrionária, os embriões quiméricos não possuem ZP, portanto, o tradicional cultivo em grupos, isto é, em microgotas de 100  $\mu\text{L}$ , não é viável, pois pode resultar na separação ou extrusão dos blastômeros, ou mesmo numa compactação ineficiente (VAJTA *et al.* 2005).

Sendo assim, no presente estudo, o sistema de cultivo em microgotas de 10  $\mu\text{L}$  e o sistema em WOW modificado (FELTRIN *et al.* 2006) foram avaliados quanto à sua eficiência na produção *in vitro* de quimeras de embriões *Mus musculus domesticus*.

Neste experimento, os micropoços apresentaram melhores resultados na produção de embriões quiméricos quando comparados ao sistema em microgota de 10  $\mu\text{L}$ . Uma das possíveis explicações deve-se ao fato de que o micropoço, por ter um diâmetro similar ao da ZP, possibilita uma maior estabilidade, ou seja, mantém o estado de agregação dos blastômeros, favorecendo assim a compactação e a formação posterior da blastocelule.

De acordo com Zeilmaker (1973), somente a justaposição dos pares de embriões, não foi o suficiente para a agregação das massas celulares, logo, é provável que no cultivo em microgotas, por não possuir um mecanismo físico de aproximação das células embrionárias como no sistema WOW, haja a necessidade da exposição de tais componentes celulares à fitohemaglutinina que força os embriões uns contra os outros como descrito por Lu; Markert (1980).

Segundo Vajta *et al.* (2000), o microambiente criado pelo sistema WOW proporciona uma maior concentração de fatores autócrinos e parácrinos, o que poderia favorecer o desenvolvimento embrionário, conforme observado no nosso experimento.

O sistema WOW apresenta excelentes resultados quando se refere ao cultivo individual, podendo ultrapassar a taxa de 50% de blastocisto (VAJTA *et al.* 2000), sendo similar ao cultivo em grupo de embriões com ZP. No presente trabalho, a taxa de

desenvolvimento embrionário dos embriões quiméricos até blastocisto foi menor que o grupo controle, com ZP, porém foi superior a 50%. Assim, a presença ou ausência da ZP não deve ter sido o fator responsável por essa diferença, conforme Ribeiro *et al.* (2009) demonstraram que a ausência da ZP não compromete o desenvolvimento do embrião.

Dentre os estádios de desenvolvimento utilizados para agregação das massas embrionárias, os melhores resultados foram obtidos com os pares de embriões de oito e 16 células. Uma provável explicação seja que os pares de embriões de quatro células apresentavam baixa coesão celular, isto é, não compactados, assim, conseqüentemente, alta tendência de desagregação dos blastômeros após a remoção da ZP. O processo de compactação implica uma maior expressão das moléculas de adesão na superfície dos blastômeros, logo, formando uma massa celular interna firmemente agregada (SURANI; BARTON, 1984).

## 6 CONCLUSÃO

Dentre os dois sistemas de cultivo *in vitro* testados, no presente experimento, para a produção de embriões quiméricos murinos, o WOW modificado proporcionou maiores taxas de agregação de massas celulares e taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto que o sistema de CIV em microgotas, por possivelmente mimetizar a ZP, permitindo um microambiente mais favorável ao desenvolvimento *in vitro*.

Portanto, o sistema WOW modificado (FELTRIN *et al.* 2006) é mais eficiente para a produção *in vitro* de quimeras de embriões *Mus musculos domesticus* que o cultivo em microgotas.

## 7 PERSPECTIVAS

Sabe-se que estudos realizados com o modelo de fusão de embriões são de grande interesse para analisar o processo do desenvolvimento embrionário. Por exemplo, quando se agregam embriões de quatro células com embriões de oito células, existe uma grande possibilidade do estágio de oito células formar o embrião, enquanto que o estágio de quatro células provavelmente formará o trofoblasto. Considerando isso, deve-se observar que o trofoblasto é que interage com o útero, assim, essa técnica poderia ser usada nas transferências embrionárias entre espécies diferentes. A produção de um embrião quimérico constituído por trofoblasto compatível com o receptor e com células somáticas de uma espécie de interesse, que seja filogeneticamente próxima, poderia ser a solução para melhorar a eficiência da clonagem. O procedimento requer, portanto, aperfeiçoamento para a correta aplicação da técnica, necessária não somente à recuperação de espécies em extinção, mas também ao incremento da produção animal.

É inquestionável que progressos têm sido obtidos através do uso de transferência nuclear na produção de animais transgênicos, porém a baixa eficiência continua limitando um maior uso dessa tecnologia. Entretanto os resultados obtidos, na chamada clonagem terapêutica (RALSTON; ROSSANT, 2010), sugerem que futuramente a transferência nuclear, provavelmente, terá uma participação de destaque na medicina humana.

Para permitir uma melhor exploração do grande potencial da produção de animais transgênicos por transferência nuclear, utilizando-se do modelo quimera, faz-se necessário que os resultados obtidos sejam melhorados, repetitivos e mais previsíveis.

## REFERÊNCIAS

- BAGUISI, A. *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, p. 456-461, 1999.
- BAPTISTA, L. P. C. **Variabilidade na produção de embriões *Mus domesticus domesticus***. 2004. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- BRADLEY, A. *et al.* Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. **Nature**, Cambridge, v. 309, p. 255-256, 1984.
- CAMPBELL, K. H. Ten years of cloning: questions answered and personal reflections. **Cloning and Stem Cells**, United Kingdom, Larchmont, v. 9, p. 8-11, 2007.
- CIBELLI, J. B. *et al.* Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, New York, v. 280, p.1256-1258, 1998.
- FELTRIN, C. *et al.* *In vitro* bovine embryo development after nuclear transfer by HMC using a modified WOW culture system. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 18, p.126-126, 2006.
- FREITAS, V. J. F. *et al.* Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 79, p. 1-8, 2007.
- GARDNER, R. L. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. **Nature**, Cambridge, v. 220, p. 596-597, 1968.
- GERGER, R. P. C. *et al.* *In vitro* development of cloned bovine embryos produced by handmade cloning using somatic cells from distinct levels of cell culture confluence. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 295-302, 2010.
- GORDON, J. W.; RUDDLE, F. H. Integration and stable germ line transformation of genes injected into mouse pronuclei. **Science**, New York, v. 214, p. 1244-1246, 1981.
- GOSSLER, A. *et al.* Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 83, p. 9065-9069, 1986.
- HUANG, B. *et al.* Generation of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Transgenic Chimeric and Nuclear Transfer Embryos Using Embryonic Germ-Like Cells Expressing Enhanced Green Fluorescent Protein. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, p. 103-108, 2010.
- JAENISCH, R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 73, p. 1260-1264, 1976.
- JIA, W. *et al.* A caprine chimera produced by injection of embryonic germ cells into a blastocyst. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, p. 340–348, 2008.



KATO, Y. *et al.* Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**, New York, v. 282, p. 2095-2098, 1998.

KEEFER, C. L. *et al.* Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and non-transfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaing, v. 64, p. 849-856, 2001.

KRISHER, R. L.; WHEELER, M. B. Towards the use of microfluidics for individual embryo culture. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 22, P. 32-39, 2010.

KUROIWA, Y. *et al.* Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, p. 889-894, 2002.

LEE, K. H. *et al.* An alternative simple method for mass production of chimeric embryos by coculturing denuded embryos and embryonic stem cells in Eppendorf vials. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 228-237, 2007.

LU, T.; MARKERT, C. L. Manufacture of diploid/tetraploid chimeric mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 77, p. 6012-6016, 1980.

MATSUI, Y.; ZSEBO, K.; HOGAN, B. L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. **Cell**, Cambridge, v. 70, p. 841-847, 1992.

MINTZ, B. Experimental study of the developing mammalian egg: removal of the zona pellucida. **Science**, New York, v. 138, p. 594-595, 1962.

MINTZ, B.; ILLMENSEE, K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 72, p. 3585-3589, 1975.

PESQUEIRO, J. B. *et al.* Animais transgênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 27, p. 52-56, 2002.

PEURA, T. T.; LEWIS, I. M.; TROUNSON, A. O. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. **Molecular reproduction and development**, New York, v. 50, p. 185-191, 1998.

POLEJAEVA, I. A.; CAMPBELL, K. H. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, p.117-126, 2000.

RALSTON, A.; ROSSANT, J. The genetics of induced pluripotency. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, v. 139, p. 35-44, 2010.

RIBEIRO, E. S. *et al.* Developmental potential of bovine handmade cloned embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. **Cloning Stem Cells**, United Kingdom, v. 11, p. 377-386, 2009.

- SALAMONE, D. *et al.* High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.124, p. 469-472, 2006.
- SCHNIEKE, A. E. *et al.* Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, New York, v. 278, p. 2130-2133, 1997.
- SURANI, M. A. H.; BARTON, S. C. Spatial distribution of blastomeres is dependent on cell division order and interactions in mouse morulae. **Developmental Biology**, New York, v.102, p. 335-343, 1984.
- TARKOWSKI, A. K. Mouse chimaeras developed from fused eggs. **Nature**, Cambridge, v. 190, p. 857-860, 1961.
- TAM, P. P.; ROSSANT, J. Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. **Development**, Cambridge, v. 130, p. 6155-6163, 2003.
- VAJTA, G. *et al.* New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the well of the well (WOW) system. **Molecular reproduction and development**, New York, v. 55, P. 256-264, 2000.
- VAJTA, G. *et al.* Somatic cell cloning without micromanipulators. **Cloning**, Larchmont, v.3, p. 89-95, 2001
- VAJTA, G. *et al.* Bovine somatic cell cloning without micromanipulators: optimization of certain parameters. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 57, p. 453, 2002.
- VAJTA, G. *et al.* Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*. **Biology of Reproduction**, Champaing, v. 17, p. 97-112, 2005.
- VAJTA, G. *et al.* The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 17, p. 73-81, 2008.
- WAKAYAMA, T. *et al.* Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. **Science**, New York, v. 292, p. 740-743, 2001.
- WHITTINGHAM, D. G. Culture of mouse ova. **Journal of reproduction and fertility**, Oxford, v. 14, p. 7-21, 1971. Supplement.
- WILMUT, I. *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, Cambridge, v. 385, p. 810-813, 1997.
- WILMUT, I.; CAMPBELL, K.; TUDGE, C. **Dolly: a segunda criação**. Rio de Janeiro: objetiva, 2000. p. 394.
- YANG, B. C. *et al.* Development of vitrified-thawed bovine oocytes after in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 103, p. 25-37, 2007.

ZEILMAKER, G. H. Fusion of rat and mouse morulae and formation of chimaeric blastocysts. **Nature**, Cambridge, v. 242, p. 115-116, 1973.