

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



RENATA BATISTA DA SILVA LOZA TELLERIA

**IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA DE VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES
MURINOS NO BIOTÉRIO DO INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER -
INCA: EFEITOS SOBRE A VIABILIDADE EMBRIONÁRIA**

RIO DE JANEIRO
2016

RENATA BATISTA DA SILVA LOZA TELLERIA

**IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA DE VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES
MURINOS NO BIOTÉRIO DO INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER -
INCA: EFEITOS SOBRE A VIABILIDADE EMBRIONÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação - stricto sensu -
Mestrado Profissional em Formação para a
Pesquisa Biomédica, do Instituto
de Biofísica Carlos Chagas Filho,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Formação para a Pesquisa Biomédica.

Orientador: Enrrico Bloise
Co-orientador: Tania Maria Ruffoni Ortiga

RIO DE JANEIRO
2016



FICHA CATALOGRÁFICA

Telleria, Renata Batista da Silva Loza.

Implementação da técnica de vitrificação de embriões murinos no biotério do Instituto Nacional do Câncer- INCA: efeitos sobre a viabilidade embrionária. / Renata Batista da Silva Loza Telleria. - Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2016.

63 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Enrrico Bloise.

Coorientadora: Tania Maria Ruffoni Ortiga.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, IBCCF, Mestrado Profissional em formação para a Pesquisa Biomédica, 2016.

Referências bibliográficas: f. 57-63.

1. Animais de laboratório. 2. Muridae- embriologia. 3. Tecnologia Reprodutiva Assistida. 4. Criopreservação- métodos. 5. Vitrificação. 6. Camundongos Endogâmicos. 7. Ciências Biomédicas - Tese. I. Bloise, Enrrico. II. Ortiga, Tania Maria Ruffoni III. UFRJ, IBCCF, Mestrado Profissional em Formação para Pesquisa Biomédica. IV. Título.



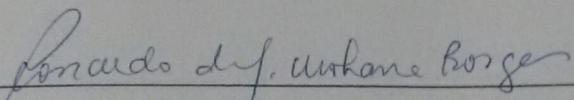
"Implementação da técnica de vitrificação de embriões murinos no biotério do Instituto Nacional do Câncer – INCA: efeitos sobre a viabilidade embrionária"

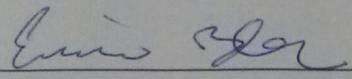
RENATA BATISTA DA SILVA LOZA TELLERIA

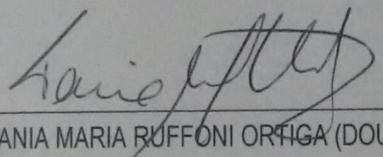
DISSERTAÇÃO DE Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica
SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

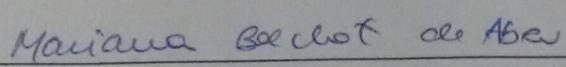
APROVADA POR:

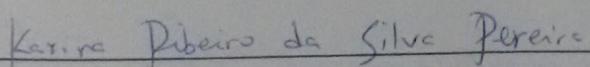
Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2016.

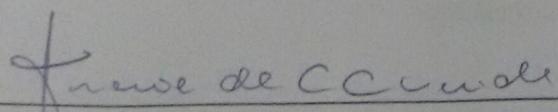

RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES (DOUTOR – UFRJ)
(COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)

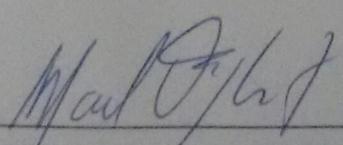

DR. ENRRICO BLOISE (DOUTOR – UFMG) – ORIENTADOR


DRA. TANIA MARIA RUFFONI ORTIGA (DOUTOR – UFRJ) - COORIENTADOR


DRA. MARIANA BOECHAT DE ABREU (DOUTOR – UFRJ) – REVISOR


DRA. KARINA RIBEIRO DA SILVA PEREIRA (DOUTOR – UFRJ)


DRA. LUCIENE DE CARVALHO CARDOSO WEIDE (DOUTOR – UFF)


DR. MARCEL FRAJBLAT (DOUTOR – UFRJ)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Ana Maria e Miguel, grandes exemplos de perseverança,
e à minha filha Júlia, que transmite
o verdadeiro significado do amor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus e a minha família por terem me ajudado a seguir nessa caminhada. Agradeço aos meus pais por me darem apoio e suporte, ao meu companheiro Rainer, tanto pelo apoio, quanto por ter passado boa parte do tempo com nossa filha Júlia, nos muitos momentos em que não pude estar presente. Às minhas irmãs Ana Cristina e Gisele pelo incentivo, e aos meus amigos pelo apoio incondicional.

Também gostaria de agradecer às pessoas diretamente envolvidas nesse trabalho: meu orientador Dr. Enrrico e co-orientadora Dra. Tania, por toda a dedicação, paciência e, principalmente, por ter acreditado em mim e me dado essa oportunidade, à Talita Fernandes, médica veterinária Tecnologista do INCa e grande parceira nos experimentos que tornaram possível essa Dissertação.

Agradeço também ao Dr. Marcel Frajblat pelo auxílio, e às Biomédicas Rayssa Alves e Carolina Lauritzen, assim como à Veterinária Isabella Folhadella e ao Biólogo Cristiano Sobral, do SBDA/Fiocruz.

Agradeço a todos do Biotério do INCa pela amizade e companheirismo durante essa jornada, e também por todo o suporte e auxílio durante os experimentos. Também agradeço à Dra. Marisa Breitenbach, Coordenadora do Centro de Pesquisas do INCA, e ao Dr. Martin Bonamino, por terem confiado em mim e me oferecido a oportunidade de desenvolver um trabalho pioneiro dentro do Instituto.

Meu sinceros agradecimentos a todos vocês!

RESUMO

TELLERIA, Renata Batista da Silva Loza. **Implementação da técnica de vitrificação de embriões murinos no biotério do Instituto Nacional do Câncer - INCa: efeitos sobre a viabilidade embrionária.** Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Introdução: As técnicas de reprodução assistida de camundongos são importantes ferramentas utilizadas para a manutenção de linhagens isogênicas e transgênicas, e são essenciais para a otimização da produção de animais de laboratório com alto padrão genético e sanitário. **Objetivo:** A presente dissertação foi desenvolvida objetivando a formação de um banco de embriões murinos no biotério de camundongos do Centro de Pesquisas (CPQ) do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCa). **Métodos:** Para a obtenção de embriões, fêmeas da linhagem B6 albino foram superovuladas e posteriormente acasaladas. Embriões em estágio de duas células foram coletados e divididos em dois grupos, controle e criopreservado (CrioP). Os embriões do grupo controle foram cultivados por 70-72 h até o estágio de blastocisto (pré-implantacional). Embriões de duas células do grupo CrioP foram congelados pela técnica de vitrificação utilizando-se crioprotetores. Após descongelamento, os embriões foram cultivados por 70-72 h até que alcançassem o estágio de blastocisto. Número e estágio de desenvolvimento dos embriões pós-cultivo foram analisados. Para se avaliar a eficiência da técnica de criopreservação selecionada, blastocistos cultivados foram corados com iodeto de propídeo e bisbenzimidida para identificação e quantificação das duas linhagens celulares que compõem o blastocisto, as células da massa celular interna (ICM) e do trofoectoderma (TE). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Teste t foi aplicado e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. **Resultados:** Obteve-se uma taxa de sucesso de 77,27% de blastocistos desenvolvidos após cultivo de embriões de duas células do grupo controle, contra 11,41% do grupo CrioP. A razão do número de células TE:ICM foi de 2,40 nos dois grupos estudados. **Conclusão:** A técnica de vitrificação de embriões murinos foi implementada no biotério de camundongos do Centro de Pesquisas (CPQ) do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCa). A técnica de vitrificação de embriões selecionada para o congelamento de embriões da linhagem B6 albina foi capaz de gerar embriões viáveis e com potencial para se desenvolverem em fetos.

Palavras-chave: vitrificação, banco de embriões, congelamento de embriões de camundongos, biotério, camundongos, INCa.

ABSTRACT

TELLERIA, Renata Batista da Silva Loza. **Implementation of the murine embryo vitrification technique in the animal facility core of the National Cancer Institute - INCA: effects on embryo viability.** Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Introduction: Assisted reproduction techniques in mice are important tools for the maintenance of isogenic and transgenic lines, and are essential for optimizing the production of laboratory animals with high genetic and sanitary standards. **Objective:** This work was designed in order to develop and establish a database of viable mouse embryos in the mouse facility core of the National Cancer Institute José Alencar Gomes da Silva (INCa). **Methods:** The albino B6(Cg)Tyr2J/J mice strain females were superovulated, mated and subjected to two-cell stage embryo collection. Harvested embryos were divided in two groups, control and cryopreserved (CrioP). Control group embryos were cultured for 70-72 hours until they reached the blastocyst stage (pre-implantation stage). Two cells embryos from CrioP group were frozen using the vitrification technique embedded in cryoprotectors. After thawing, embryos were cultured for 70-72 hours until they reached the blastocyst stage. Number and stage of development of post-culture embryos were analyzed. To evaluate the efficiency of selected cryopreservation technique cultured blastocysts were stained with propidium iodide and bisbenzimidazole for identification and quantification of both cell lines present in the blastocyst, the inner cell mass (ICM) and trophoctoderm (TE) cells. The results were expressed as mean \pm standard error of the mean. T- test was used and differences were considered significant at $p < 0.05$. **Results:** a success rate of 77.27% of blastocysts developed after growing two cells control group embryos was obtained, against 11.41% in the CrioP group. The ratio of the number of cells TE:ICM cells was 2.40 in both groups. **Conclusion:** Implementation of the CrioP technique in the mouse facility core of INCA was successfully performed. The selected vitrification methodology chosen for the vitrification B6 albino embryos was capable to produce viable embryos that have the potential to develop into fetuses.

Keywords: Vitrification, embryo bank, mice embryo freezing, animal facility, mice, INCa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS -----	10
LISTA DE TABELAS -----	11
LISTA DE SIGLAS / ABREVIATURAS -----	12
1. INTRODUÇÃO -----	14
1.1 Tipos de congelamento de embriões -----	19
1.2 Formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento de embriões -----	24
1.3 Crioprotetores utilizados nos processos de congelamento de embriões -----	24
1.4 Descongelamento de embriões -----	26
1.5 Sobrevivência celular após o processo de vitrificação -----	27
1.6 Avaliação da viabilidade embrionária pós-vitrificação -----	27
1.7 A linhagem B6 albino -----	28
2. OBJETIVOS -----	30
2.1. Objetivo geral-----	30
2.2. Objetivos específicos-----	30
3. MATERIAL E MÉTODOS -----	31
3.1. Localização e animais -----	31
3.2 Desenho experimental -----	31
3.2.1 Superovulação de fêmeas com hormônios de origem nacional e importada para quantificação do número de ovócitos produzidos e definição de dose hormonal a ser utilizada -----	32
3.2.2 Produção, coleta e contagem de embriões híbridos F1 -----	33
3.2.3 Produção, coleta e vitrificação de embriões de B6 albino -----	34
3.2.4 Aquecimento de embriões de B6 albino -----	37
3.2.5 Cultivo de embriões de duas células de B6 albino até o estágio de blastocisto -----	38

3.2.6 Avaliação da viabilidade dos blastocistos -----	38
3.2.7 Análise estatística -----	40
4. RESULTADOS -----	41
4.1. Padronização de protocolo hormonal de superovulação murina -----	41
4.2. Padronização da produção e coleta de embriões murinos híbridos -----	42
4.3. Produção e vitrificação de embriões da linhagem B6 albino visando a formação do banco de embriões -----	44
4.4. Eficiência da técnica de vitrificação de embriões B6(Cg)Tyr2J/J (B6 albino) pós-aquecimento -----	45
4.5 Avaliação da viabilidade embrionária pós-aquecimento-----	45
5. DISCUSSÃO -----	48
5.1 Eficiência na superovulação de fêmeas de camundongos-----	48
5.2 Produção de embriões híbridos x embriões de linhagens puras isogênicas-----	49
5.3 Congelamento rápido de embriões-----	50
5.4 Viabilidade de embriões congelados, aquecidos e cultivados-----	51
5.5 Viabilidade de embriões por meio de coloração diferencial de blastocistos-----	52
6.CONCLUSÃO -----	55
7. PERSPECTIVAS FUTURAS -----	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	57

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1.</u> Representação do processo de segmentação embrionária em camundongos	
<u>Figura 2.</u> Etapas do congelamento lento de embriões -----	17
<u>Figura 3.</u> Morfologia embrionária durante as etapas de aquuecimento de embriões -----	21
<u>Figura 4.</u> Fluxograma de experimentos desenvolvidos para obtenção e avaliação de embriões -----	26
<u>Figuras 5 e 6.</u> Abertura da cavidade abdominal de fêmeas para retirada das tubas uterinas e posterior coleta dos embriões -----	35
<u>Figura 7.</u> Embriões de duas células demonstrando sinais de degeneração, e embriões normais, com blastômeros simétricos -----	36
<u>Figura 8.</u> Vitrificação ou congelamento rápido de embriões de camundongos ----	37
<u>Figura 9.</u> Resposta à superovulação induzida após estímulo com 10 UI de PMSG e de hCG. ANOVA de dois fatores (média \pm s.e.m) -----	41
<u>Figura 10.</u> Resposta à superovulação induzida após estímulo com 7,5 e 10 UI de PMSG e de hCG em fêmeas Balb/c. Teste T de Student (média \pm s.e.m) -----	42
<u>Figura 11.</u> Ovócitos obtidos em camundongos fêmeas da linhagem Balb/c após superovulação com 7,5 UI de PMSG e de hCG -----	42
<u>Figura 12.</u> Zigotos, ou ovócitos não fertilizados, obtidos 36 horas depois da administração do hormônio hCG e acasalamento (dia 1.5 de gestação). Aumento de 40x -----	43
<u>Figura 13.</u> Embriões obtidos do acasalamento de duas linhagens isogênicas (híbridos) de duas células obtidos após superovulação. Aumento de 40x -----	43
<u>Figura 14.</u> Blastocistos em diferentes graus de desenvolvimento. Aumento de 40x -----	44
<u>Figura 15.</u> Blastocistos expandidos (A e B) e eclodidos (C e D) dos grupos controle e CrioP, respectivamente, após cultivo <i>in vitro</i> de embriões em estágio de duas células, por um período de 70-72 horas. Aumento de 40x -----	46
<u>Figura 16.</u> Blastocistos expandidos do grupo controle (A e C) e CrioP (B e D) após cultivo <i>in vitro</i> desde o estágio de duas células ate blastocisto, por um período de 70-72 horas, após coloração diferencial. Aumento de 200x -----	47

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1.</u> Parâmetros biológicos, fisiológicos e reprodutivos de camundongos -- -----	15
<u>Tabela 2.</u> Principais diferenças entre as técnicas de congelamento lento e rápido (vitrificação) utilizadas na criopreservação de embriões -----	20
<u>Tabela 3.</u> Vantagens e desvantagens do congelamento lento e da vitrificação na criopreservação de embriões -----	21
<u>Tabela 4.</u> Resultados obtidos nos experimentos de superovulação, coleta e cultivo de embriões híbridos de camundongos (C57BL/6 x BALB/c, n=8) -----	43
<u>Tabela 5.</u> Dados obtidos da coleta, congelamento, aquecimento e cultivo de embriões da linhagem B6(Cg)Tyr2J/J (B6 albino, n=94) -----	44
<u>Tabela 6.</u> Eficiência da técnica de vitrificação de embriões. -----	45
<u>Tabela 7:</u> Número de linhagens celulares em blastocitos expandidos, derivados dos grupos controle (n=6) e CrioP (n=6) -----	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C – antes de Cristo

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPQ – Centro de Pesquisas

CrioP – grupo experimental de embriões que foram criopreservados

DAP213 – mistura de crioprotetores DMSO 2M, Acetamida 1M e Propilenoglicol 3M

DMSO – dimetilsulfóxido

eCG– do inglês, “equine chorionic gonadotrofin”, Gonadotrofina coriônica equina

FIV – Fertilização in vitro

hCG – do inglês, “human chorionic gonadotrofin”, Gonadotrofina coriônica humana

HEPES - ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico, tampão existente no meio de HTF, para coleta dos embriões

HTF – do inglês, “human tubarian fluid” fluido tubário humano, meio utilizado para coleta de embriões de camundongos.

ICM – do inglês, “internal cellular mass”, Massa celular interna ou embrioblasto

INCa – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

IP – intraperitoneal

IRF2BP2 – do inglês, “interferon regulatory factor 2 binding protein 2”, refere-se a uma linhagem transgênica de camundongos

IVC – do inglês “individually ventilated cage”, gaiola individual ventilada

MEM – do inglês, “Minimum Essential Medium”, meio de cultivo básico para diluição dos corantes fluorescentes

OT-I – linhagem transgênica de camundongos

PMSG – do inglês, “pregnant’s mare serum gonadotrofin”, Gonadotrofina sérica da égua prenhe

S.E.M. – do inglês, “standard error of the mean”, erro padrão da média

SSM – do inglês, “single step medium”, meio de cultivo de embriões até a fase de blastocisto

SSS – Soro substituto sintético, utilizado para suplementação do meio de cultivo

TE – Trofoectoderma ou trofoblasto

UI – Unidades internacionais

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia integra um conjunto de técnicas capacitadoras que possibilitam utilizar, alterar e otimizar organismos vivos, células, organelas ou biomoléculas, com a finalidade de gerar produtos e serviços especializados nas áreas da saúde, envolvendo conhecimentos das áreas de biologia molecular, genética, reprodução, fisiologia humana e animal, dentre outras (BRASIL, 2008). A biotecnologia se aplica tanto para a inovação radical (que envolve descobertas originais), como para a inovação incremental, que pode representar apenas melhorias em processos já existentes. Na área da saúde, a biotecnologia tem sido aplicada para o desenvolvimento de vacinas, terapia gênica e celular, desenvolvimento e uso de células-tronco embrionárias, bem como na recém-criada célula sintética. Além disso, uma aplicação importante da biotecnologia está no desenvolvimento de biofármacos, que podem ser entendidos como proteínas recombinantes destinadas à terapêutica. (FERRO, 2010).

Um importante componente da Biotecnologia, assim como de outras fronteiras da ciência é a ciência de animais de laboratório. A utilização de animais na pesquisa já era conhecida há mais de 400 anos a.C., quando cientistas da época realizavam disseções e necropsias em animais, com a finalidade de constatar semelhanças e diferenças de formação e funcionamento de sistemas (NEVES; MANCINI FILHO; MENEZES., 2013). Há grande homologia genotípica e semelhanças fisiológicas entre homem e camundongo quando comparado a outros modelos animais como *Xenopus* sp. e *Drosophila melanogaster*, pois a divergência evolutiva entre homem e camundongo é menor quando comparada a estes últimos. Somando-se ao fato de o genoma murino ser o segundo mais estudado entre os mamíferos, perdendo apenas para o humano, a escolha deste animal como modelo experimental em diversas fronteiras da ciência é uma estratégia muito bem sucedida (GODARD, 2008).

Como modelo experimental em pesquisa científica, a utilização de animais têm sido de extrema importância. Os animais de laboratório são recursos biológicos usados como instrumentos de medição e avaliação que reagem a fatores internos, relacionados a suas condições sanitárias, e a fatores externos, relacionados ao meio ambiente. Assim, os experimentos definidos e padronizados realizados com estes animais são imprescindíveis para assegurar a confiabilidade e reprodutibilidade nas pesquisas biológicas (BRAGGIO; MARTINS; VALERO, 2003). Recentemente, os

avanços na área de manipulação genética têm permitido o desenvolvimento de um grande número de novos modelos animais através do uso da tecnologia transgênica, principalmente em camundongo, para estudos básicos e aplicados (CECAL, 2016).

O camundongo (*Mus musculus*) é o modelo experimental de escolha para a pesquisa oncológica moderna. Estes animais tiveram seu sistema imunológico e genético extensivamente estudado, permitindo o desenvolvimento de uma variedade de linhagens transgênicas com características genéticas definidas; assim, tornando-os bem apropriados para o desenvolvimento de diferentes modelos de câncer (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Além disso, esta espécie possui alta taxa de fertilidade, pequeno porte e um curto ciclo de vida, possibilitando avaliar o objeto da pesquisa em questão por diversas gerações, em um período de tempo reduzido. Adicionalmente, o uso de modelos murinos para xenotransplantes, procedimento em que tecidos ou linhagens celulares humanas são implantadas em camundongos, permite uma rápida e relativamente fácil avaliação *in vivo* do potencial tumorigênico de determinado material biológico ou do efeito antitumoral de novas drogas, tornando essa uma técnica imprescindível na pesquisa oncológica (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). A Tabela 1 enfatiza algumas particularidades da fisiologia dos camundongos.

Tabela 1. Parâmetros biológicos, fisiológicos e reprodutivos de camundongos (adaptado de NEVES; MANCINI FILHO; MENEZES, 2013).

Parâmetros	Camundongos
Peso ao nascer	1-2 g
Peso ao desmame	10-15 g
Peso adulto (macho)	25-50 g
Peso adulto (fêmea)	25-45 g
Adulto jovem (idade)	6 semanas
Início da idade reprodutiva	6-8 semanas
Final da idade reprodutiva	8-10 meses
Ciclo estral	4-5 dias
Duração do estro	10-20 horas
Mecanismo de ovulação	Espontânea
Período de gestação	19-21 dias

Continua

conclusão

Parâmetros	Camundongos
Idade do desmame	19-28 dias

O conhecimento dos processos reprodutivos de pequenos roedores é de fundamental importância para a manutenção de um biotério de pesquisa. O ciclo estral é o período compreendido entre dois estros, de duração entre 4-5 dias, em camundongos, apresentando fases bastante evidentes e caracterizado por modificações tanto da genitália quanto do comportamento animal. As fases do ciclo e seus respectivos tempos de duração são: proestro – 12 horas, no qual ocorre a maturação dos folículos; estro – 12 horas, com a ovulação; metaestro – 21 horas, onde ocorre a formação do corpo lúteo, se não houver ocorrido fecundação, e diestro – 57 horas, com a regressão do corpo lúteo. O proestro e o estro são também chamadas de fases estrogênicas ou proliferativas, com atuação predominante do hormônio FSH. As fases de metaestro e diestro são chamadas de fases progesterônicas ou secretoras, onde a progesterona é o hormônio liberado em maior quantidade. Após o diestro, caso as fêmeas não entrem em contato com os feromônios de machos, entram em uma fase denominada anestro, na qual o ovário está inativo, e não ocorre amadurecimento folicular (ANDRADE, PINTO, OLIVEIRA, 2002). A Figura 1 ilustra a morfofisiologia do desenvolvimento embrionário em camundongos.

A superovulação é uma técnica reprodutiva que visa maximizar a produção de ovócitos. Os hormônios PMSG e hCG, utilizados na metodologia de superovulação para produção embrionária (protocolo que será detalhado posteriormente), possuem como objetivo mimetizar os efeitos dos hormônios FSH e progesterona, respectivamente. Dessa forma, promove-se inicialmente a maturação folicular, com a aplicação do hormônio PMSG, e posteriormente, a ovulação, com a aplicação do hormônio hCG.

O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCa), fundado pelo Presidente Getúlio Vargas em 13 de janeiro de 1937, é órgão auxiliar do Ministério da Saúde no desenvolvimento e coordenação das ações integradas para a prevenção e o controle do câncer no Brasil. (BRASIL, 2008). No Centro de Pesquisas do INCa está localizado o biotério, setor responsável pela criação de

animais utilizados em pesquisas relacionadas aos mecanismos envolvidos no processo de desenvolvimento e controle do câncer.

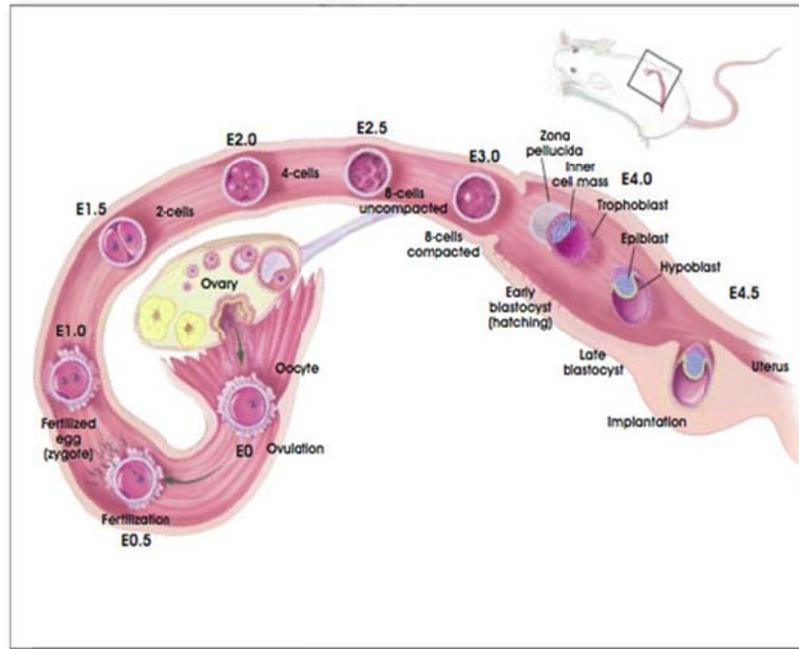


Figura 1: Representação do processo de segmentação embrionária em camundongos (US Department of Health & Human Services, 2001). Disponível em <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/appendixa.aspx>

O biotério do INCa apóia as áreas estratégicas de pesquisa e ensino do Instituto, além de colaborar com outros centros de excelência em pesquisa no Rio de Janeiro e no Brasil, incluindo a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Universidade Federal Fluminense (UFF), entre outras. A finalidade do biotério é produzir camundongos a partir de matrizes selecionadas e certificadas quanto ao perfil genético e sanitário, para atender às necessidades dos usuários e colaborar ativamente para o desenvolvimento de projetos de pesquisa que envolvam animais de laboratório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Atualmente, o mesmo disponibiliza diversas linhagens isogênicas, como Balb/c e C57BL/6, animais *knockouts*, como Balb/c NUDE e NOD scid, os quais representam os principais modelos para o estudo de tumores por meio de ensaios de xenotransplantes e modelos ortotópicos, e ainda linhagens transgênicas, como IRF2BP2.

Atualmente, alguns dos principais projetos desenvolvidos no INCa com animais de experimentação, são (dados de 2015);

- “Ensaio pré-clínicos de antineoplásicos da família das tiazicridinas e de um inibidor natural de metaloproteases”;
- “Estudo do papel do fator de transcrição NFAT1 em células dendríticas”;
- “Estratégias para modulação de linfócitos e sua utilização em imunoterapia”;
- “Estudo do papel dos fatores de transcrição NFAT na regulação gênica e estudo da influência do metabolismo tumoral na ativação e função de células T CD8+”;
- “Alterações genéticas e epigenéticas induzidas pelo exercício físico nas fases iniciais da carcinogênese de cólon”.

Todos os projetos conduzidos no Instituto foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto (CEUA/INCa), cadastrada no Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sob o número 01.0171.2014.

A despeito da importância da criação de animais de experimentação, a mesma mostra-se dispendiosa, demanda mão de obra qualificada e instalações específicas que ocupam considerável espaço físico. A manutenção de linhagens como colônias abertas (sistemas de criação sem uso de barreiras sanitárias) apresenta um risco de perda das mesmas por contaminação sanitária ou genética, ou por redução da fertilidade.

A descoberta de que embriões de mamíferos são capazes de se desenvolver quando transferidos entre fêmeas de uma mesma espécie incentivou o desenvolvimento de técnicas de armazenamento de embriões. A criopreservação de embriões de camundongos, alcançada com sucesso em 1972 (WHITINGHAM *et al.*, 1972), aliada a técnicas de superovulação, é uma metodologia difundida e a forma mais segura de preservação do patrimônio genético murino utilizada atualmente (PIASSI *et al.*, 2009).

A instalação de laboratórios de manipulação de embriões em centros produtores de modelos animais, além de possibilitar importantes vantagens, como o banco de embriões e a possibilidade de descontaminação para agentes de transmissão vertical, também se mostra essencial nas etapas de produção de animais de laboratório geneticamente modificados. Os embriões que compõem o banco não necessitam de grandes cuidados, bastando-lhes um suprimento de nitrogênio líquido para que permaneçam congelados. Por isso, a utilização de

tecnologias de manipulação de embriões em pesquisa é deveras ampla. Com elas, podem ser manipulados desde embriões de uma célula até indivíduos em estágio de blastocisto, permitindo, dessa forma, a produção de transgênicos, knockouts e quimeras, entre outros (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

As colônias de camundongos em biotérios estão permanentemente sujeitas a acidentes que não podem ser totalmente evitados, mesmo com programas intensivos e minuciosos de prevenção. Assim sendo, faz-se necessária uma técnica que permita a reposição dos animais que compõem uma colônia de camundongos, caso necessário. Além do prejuízo decorrente da perda de matrizes, os acidentes em biotérios podem comprometer as atividades de pesquisa que utilizam os modelos fornecidos por eles, gerando graves consequências. Por essa razão, a reposição imediata das colônias é muitas vezes a única alternativa para minimizar tais efeitos negativos. Com o auxílio de um banco de embriões funcional e operante, é possível o repovoamento rápido e eficiente das colônias. Uma outra grande vantagem no estabelecimento de um banco de embriões é a perpetuação dos padrões sanitários e genéticos. Através desse banco, linhagens podem ser conservadas em nitrogênio líquido, preservando, assim, suas características originais sem que haja perigo de interferência por contaminações genéticas ou sanitárias (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

O princípio do congelamento de embriões é a manutenção do metabolismo celular em estado de quiescência, podendo ser restabelecido após o período de estocagem, continuando seu desenvolvimento normal (GORDON, 1994). O objetivo principal de um protocolo de criopreservação é atingir temperaturas criogênicas sem a formação de gelo intracelular e sem danos químicos, e isso pode ser alcançado através da vitrificação. (RUBINSKY, 2003). Esse processo permite a passagem dos embriões pela zona crítica de temperatura de maneira rápida, impedindo o desenvolvimento de injúrias ocasionadas pela formação de cristais de gelo (YAVIN; ARAV, 2007). Tais injúrias podem incluir a despolimerização de microtúbulos e fragmentação do DNA, configurações anormais do fuso, anormalidades cromossômicas, distribuição desordenada ou exocitose de grânulos corticais, além de fratura da membrana citoplasmática (MOUSSA *et al.*, 2014), o que pode resultar em inviabilidade embrionária.

1.1 Tipos de congelamento de embriões

A criopreservação de embriões tem se mostrado uma ferramenta útil desde seus primeiros relatos descritos em camundongos no ano de 1972 (WHITTINGHAM; LEIBO; MAZUR, 1972). Neste âmbito, as células congeladas em nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196°C , apresentaram todas as reações bioquímicas paralisadas, impedindo qualquer alteração na célula criopreservada, conservando por longos períodos a sua identidade biológica. O aprimoramento dos protocolos de congelamento e o desenvolvimento da técnica de vitrificação levou a grandes avanços na criopreservação de embriões nos últimos trinta anos.

Dois tipos de congelamento fazem parte das técnicas mais comumente utilizadas: o congelamento lento e a vitrificação, classificado como congelamento rápido (Tabela 2).

Tabela 2: Principais diferenças entre as técnicas de congelamento lento e rápido (vitrificação) utilizadas na criopreservação de embriões (adaptado de MOUSSA *et al.*, 2014).

Congelamento lento	Vitrificação
Mais de 3 horas para ser realizado	Simple, rápido (menos de 10 min.)
Caro, requer um congelador programável	Barato, não requer uso de equipamentos
Volume de amostra 100 a 250 μL	Volume de amostra 1 a 50 μL
Formação de cristais de gelo	Não há formação de gelo
Mais danos químicos	Menos danos químicos
Baixa concentração de crioprotetores	Alta concentração de crioprotetores

O congelamento lento se baseia na desidratação celular. Conforme a temperatura declina e a água do meio se cristaliza, ocorre um aumento da concentração de solutos extracelulares e aumento do fluxo osmótico do meio intracelular para o meio extracelular. Neste, a taxa de congelamento – e a remoção de água intracelular – é controlada pelo uso de congeladores programáveis, diminuindo-se as chances de uma injúria celular pelo frio, já que a formação de gelo intracelular diminui. O componente principal para que o processo de congelamento seja bem-sucedido é o uso de crioprotetores (THORAT; INGLE, 2012). A esquematização do processo de congelamento lento está ilustrado na Figura 2.

A vitrificação é definida como a solidificação de uma solução a base de água formando um material amorfo, similar ao estado vítreo, sem a formação de cristais

de gelo, portanto, prevenindo a desidratação celular exacerbada, o que aumenta o potencial de sobrevivência celular após o aquecimento.

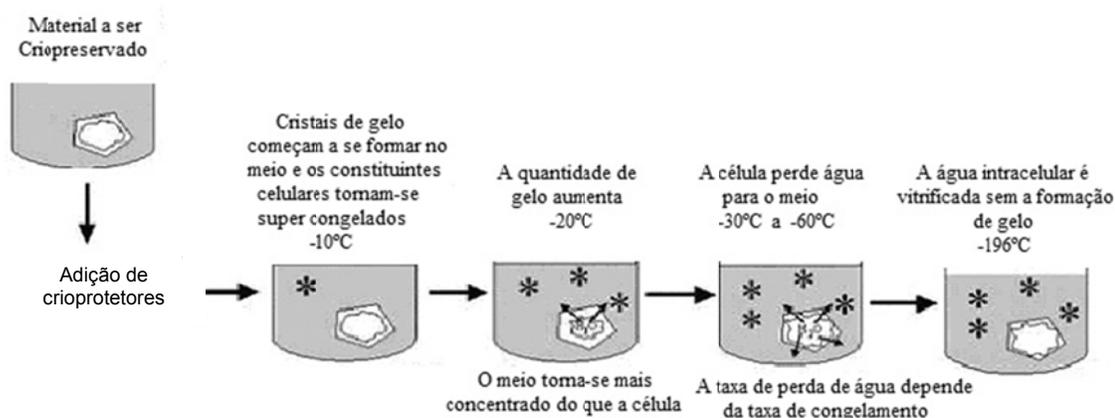


Figura 2. Etapas do congelamento lento de embriões (adaptado de BARBOSA *et al.*, 2009).

Contudo, a vitrificação somente pode ser alcançada quando utilizadas temperaturas muito baixas, além de altas concentrações de crioprotetores (ALMIÑANA; CUELLO, 2015). Como esse é o processo de congelamento mais utilizado para criopreservar embriões de camundongos, ele será amplamente descrito a seguir. A tabela 3 indica as principais vantagens e desvantagens dos dois tipos de criopreservação embrionária.

Tabela 3: Vantagens e desvantagens do congelamento lento e da vitrificação na criopreservação de embriões.

Congelamento lento		Vitrificação	
Vantagens	Desvantagens	Vantagens	Desvantagens
Utiliza baixas concentrações de crioprotetores	Tempo de exposição ao crioprotetor é grande	O tempo de contato é reduzido, para evitar danos químicos	Utiliza concentrações altas de crioprotetores ou mistura dos mesmos
O congelador pode ser programado de diferentes formas, de acordo com o crioprotetor e protocolo utilizado, e o processo é parcialmente automatizado	O custo de um congelador programável é alto	Não requer o uso de um congelador programável. Técnica mais barata	----
Contato com crioprotetores em menores concentrações, reduzindo o risco de danos químicos	Técnica lenta, devido à queda gradual da temperatura	Técnica muito rápida	----

Duzentos anos se passaram desde a primeira descrição do resfriamento da água por Gey-Lussac, onde demonstrou ser possível submetê-la a uma temperatura de -12°C sem que a mesma congelasse. Similarmente, altas taxas de sobrevivência de embriões e oócitos após o congelamento podem ser encontradas, seguindo o princípio básico de Gey-Lussac (ARAV, 2014).

A criopreservação de embriões humanos foi inicialmente descrita na década de 80, onde taxas mais altas quanto à sobrevivência, implantação e desenvolvimento embrionário são encontradas quando utilizada a vitrificação em relação ao congelamento lento (CARVALHO *et al.*, 2011).

Embriões de bovinos são facilmente criopreservados. Se o procedimento utilizado for feito de forma correta, as taxas de gestação podem alcançar 75 a 85%, após aquecimento e transferência. Embriões de camundongos apresentam diferente taxas de gestação que são altamente dependentes da linhagem criopreservada, por isso a necessidade de otimização de protocolos de criopreservação em diferentes linhagens e biotérios (AMSTISLAVSKY *et al.*, 2015). Independente da espécie, para que a técnica de criopreservação seja bem-sucedida, deve-se atentar a importantes detalhes, como o tamanho do embrião, o conteúdo lipídico e aquoso, e a permeabilidade da membrana plasmática, os quais variam não somente entre as espécies, mas durante os estágios de desenvolvimento (SEIDEL JR.; SEIDEL, 1991). Uma maior sensibilidade ao frio e conseqüentemente uma maior taxa de danos devido ao congelamento têm sido associadas ao maior conteúdo lipídico de embriões, assim como uma menor qualidade de embriões produzidos *in vitro* quando comparados aos obtidos *in vivo*. Faz-se necessário um rastreamento preliminar para cada espécie de interesse, bem como de suas características embrionárias (estágio de desenvolvimento, origem etc.) para que sejam selecionadas as condições ótimas para criopreservação. (ALMIÑANA; CUELLO, 2015).

Para o sucesso das técnicas de criopreservação de embriões de camundongos, muitos fatores devem ser levados em consideração, como a quantidade inicial de animais necessários à obtenção de um número satisfatório de embriões (entre 300 e 500) por linhagem, a idade das fêmeas, o *background* genético da linhagem – heterozigotos, homozigotos, *wild type*, animais *knock-outs*, a fertilidade dos machos utilizados etc. Além disso, é impossível precisar o número exato de embriões que serão produzidos por fêmea (SEIDEL JR.; SEIDEL, 1991).

A criopreservação por meio da vitrificação – ou congelamento rápido– aumenta a rapidez da técnica e permite acelerar significativamente o processo de criopreservação do embrião sem a utilização de um congelador programável de alto custo, tornando assim o processo rápido, prático e menos oneroso que o congelamento tradicional (NIEMANN, 1991). Além disso, o tempo de exposição dos embriões aos crioprotetores é reduzido, prevenindo a formação de cristais de gelo pelo uso de elevadas concentrações do crioprotetor (PAPADOPOULOS et al., 2002).

Os principais fatores limitantes da vitrificação são o estresse osmótico e a toxicidade química do crioprotetor, os quais causam danos às células embrionárias (PAPADOPOULOS et al., 2002); porém, o equilíbrio é buscado por meio de rápidas taxas de resfriamento, que reduzem a toxicidade dos crioprotetores e diminuem o tempo de exposição da célula às temperaturas críticas (ARAV; SHEHU; MATTIOLI, 1993).

A aceleração da curva de queda da temperatura na vitrificação, quando comparado ao congelamento lento, tem como principal vantagem a diminuição da necessidade de uma concentração muito alta de crioprotetores na solução de vitrificação, o que conseqüentemente diminui os danos osmóticos e tóxicos, pois o embrião passa rapidamente para o estado vítreo. Uma das possibilidades que visam acelerar a queda da temperatura é a utilização de suportes físicos para o embrião, que permitam um menor volume de solução crioprotetora e um contato direto entre o embrião e o nitrogênio líquido.

A criopreservação de embriões, tanto em biotérios quanto em instituições de pesquisa, é uma poderosa ferramenta. Por meio da manipulação de embriões (em todos os seus níveis), pode-se interferir em diversos protocolos experimentais, sendo que em alguns deles esta tecnologia é absolutamente indispensável (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Em camundongos a técnica de vitrificação é utilizada pelas principais instituições de pesquisa fornecedoras de camundongos. Dentre elas podemos citar: Jackson Laboratory e Charles Rivers Laboratories, ambas nos Estados Unidos, Centro Multidisciplinar para a Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas (UNICAMP), Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (antigo Centro de Criação de Animais de Laboratório/CECAL), da Fundação Oswaldo Cruz, dentre outros.

O estabelecimento do banco de embriões por meio da criopreservação permite ao biotério a manutenção de um grande número de linhagens a baixo custo. Além disso, pode-se otimizar a programação de entrega de animais à comunidade usuária. Certas linhagens, por permanecerem durante muito tempo sem solicitação de uso, são criopreservadas, podendo ser descongeladas e reimplantadas no Centro, caso haja a demanda (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

1.2 Formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento de embriões

Alterações celulares referentes à formação de cristais de gelo durante o processo de criopreservação celular foram primeiramente relatadas por Mazur em 1963, quando mostrou que a velocidade de saída da água intracelular está relacionada ao aumento da concentração do soluto extracelular, seguindo o seu equilíbrio osmótico. Assim, a velocidade de congelamento determinará o grau de retração celular, devido à desidratação, e a presença ou ausência de cristais (MAZUR, 1984). Quanto à variação do tempo de congelamento, esse pode ser expresso como lento, moderado, rápido e ultrarrápido (LEIBO, 2008). De lento a moderado, o congelamento possui taxas de resfriamento altamente controladas até atingir temperaturas de -35 a $-80^{\circ}\text{C}/\text{min}$, seguida pelo mergulho em nitrogênio líquido, a -196°C . Já uma queda de temperatura rápida ou ultrarrápida ocorre ao redor de $200^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (VAJTA; NAGY, 2006).

O congelamento e o descongelamento podem levar a um rearranjo da estrutura das membranas biológicas dos blastômeros (divisões iniciais do zigoto), interferindo em sua funcionalidade, principalmente alterando a permeabilidade seletiva e a difusão lateral de proteínas no embrião. Além disso, a formação de cristais de gelo intra e extracelulares, os quais assumem formas e tamanhos irregulares, podem afetar a micro-estrutura de membranas e organelas, comprometendo, algumas vezes de forma irreversível, a função celular (SANTIN, 2009). Neste âmbito, com o intuito de minimizar estas possíveis lesões, são utilizados crioprotetores, com a função de proteger as células e tecidos durante os processos de criopreservação e descongelamento (DOBRINSKY, 2002).

1.3 Crioprotetores utilizados nos processos de congelamento de embriões

O mecanismo de ação dos crioprotetores não é totalmente conhecido (SANTIN, 2009). Entretanto, sabe-se que a proteção celular ocorre de forma parcial, reduzindo o ponto de solidificação das soluções durante o processo de congelamento (REICHENBACH, 2002).

Os crioprotetores são solutos orgânicos, e uma de suas principais funções é remover e/ou substituir a água intracelular. Esses solutos agem conforme sua capacidade de penetrar ou não nas células e, por isso, são classificados como crioprotetores intracelulares ou extracelulares (DOBRINSKY, 2002; REICHENBACH, 2002).

Dimetilsulfóxido (DMSO), etileglicol, glicerol, propanodiol e butanodiol são os crioprotetores intracelulares mais comumente usados (HOLT, 2000). Suas propriedades coligativas e ligantes da água conferem proteção celular, já que é diminuído o ponto crioscópico intracelular - temperatura na qual a água intracelular congela, aumentando a quantidade de água que permanece no estado líquido sob baixas temperaturas, reduzindo dessa forma a concentração intracelular de solutos e os danos causados pela solução (SANTIN, 2009). Diferente dos anteriores, os crioprotetores extracelulares atuam por meio de mecanismo osmótico, promovendo a desidratação celular controlada durante o congelamento e impedindo a formação de grandes cristais de gelo no interior da célula (HOLT, 2000). Este grupo é composto por macromoléculas e açúcares. Os mais utilizados são a lactose, glicose, sacarose, polivinilpirrolidona (PVP), manitol, trealose, entre outros (NIEMANN, 1991).

O mecanismo de ação pelo qual os vários agentes permeabilizantes protegem as estruturas celulares é considerado semelhante, entretanto a toxicidade geralmente é diferente. Para o congelamento, a concentração de um crioprotetor intracelular é limitada entre 1 e 2M. Nesta concentração a toxicidade é relativamente baixa e os embriões podem ser equilibrados na solução por 10 a 20 minutos à temperatura ambiente. Dentre os crioprotetores intracelulares, o etilenoglicol é o menos tóxico, seguido pelo glicerol e propilenoglicol (LUCCI *et al.*, 2004). Uma estratégia adotada a fim de diminuir a toxicidade dos crioprotetores é fazer uma mistura de dois agentes, geralmente DMSO e etilenoglicol. De acordo com alguns estudos, a mistura destas duas substâncias promove o aumento da permeabilidade celular em relação aos dois componentes utilizados de forma isolada (GARDNER,

2012). Outra forma de reduzir os danos aos embriões é expô-los aos crioprotetores de forma gradativa, em concentrações crescentes, sob baixa temperatura (0-4°C) (ALI; SHELTON, 1993).

1.4 Aquecimento de embriões

Os protocolos de aquecimento de embriões são elaborados de acordo com o tipo de congelamento empregado. Entretanto, algumas etapas são comuns para as duas formas de congelamento (lento ou rápido). Inicialmente, o critoubo ou palheta deve ser deixado pelo tempo mínimo de 30 segundos em temperatura ambiente após retirada do compartimento de nitrogênio líquido onde estava armazenado. Em sequência, os embriões devem entrar em contato com soluções de sacarose, em diferentes concentrações, e de forma seriada, a fim de que o crioprotetor possa ser gradualmente substituído por água, hidratando o embrião e restabelecendo seu potencial osmótico. As etapas de recuperação dos embriões criopreservados estão ilustradas na Figura 3.

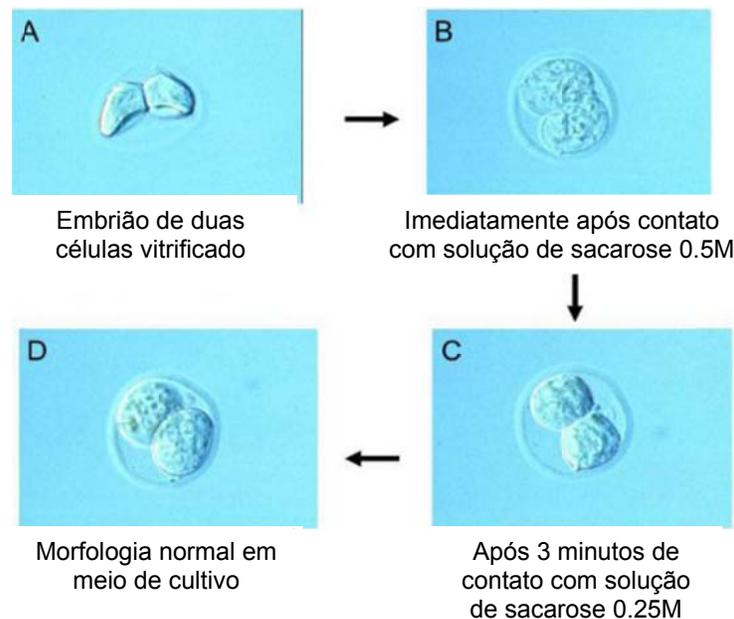


Figura 3. Morfologia embrionária durante as etapas de aquecimento de embriões (MOCHIDA *et al.*, 2011). **A.** Embrião de duas células após vitrificação, apresentando retração de blastômeros. **B.** Embrião após primeiro contato com solução de sacarose, e início do restabelecimento do potencial osmótico. **C.** Embrião após contato com a segunda solução de sacarose, e blastômeros apresentando morfologia similar ao fisiológico. **D.** Embrião com morfologia normal, após as etapas de aquecimento, apresentando blastômeros simétricos com conteúdo homogêneo e membrana preservada.

1.5 Sobrevivência celular após o processo de vitrificação

Um aspecto interessante sobre a sobrevivência de embriões após o processo de vitrificação é o fato de que eles se demonstraram mais resistentes ao efeito da criopreservação do que gametas femininos ou masculinos. Isso se deve ao fato da constituição diplóide do embrião, pois a estrutura do DNA tende a ser mais estável, e com isso aumenta a resistência da célula para os fatores de estresse específicos e não mutagênicos.

Diversas alterações fenotípicas já foram correlacionadas com a utilização de técnicas de reprodução assistida, incluindo a fertilização assistida (FIV) em animais e humanos. Alterações no processo de segmentação do zigoto, placentação, função placentária e crescimento fetal foram correlacionadas ao baixo peso ao nascer comumente associada a utilização de reprodução assistida (BLOISE *et al.*, 2012; BLOISE; FEUER; RINAUDO, 2014). Neste âmbito, apesar do uso sistemático e generalizado da criopreservação de embriões em reprodução animal e humana, estudos isolando o efeito da criopreservação embrionária induzindo alterações fenotípicas embrionárias e/ou fetais ainda são necessários.

Desta forma, a implantação de bancos de embriões murinos é de fundamental importância para a expansão dos recursos disponíveis para a pesquisa, sobretudo no Brasil. Possibilita a realização, dentro de padrões internacionais de qualidade, de pesquisas fundamentais sobre patogenia e mecanismos de proteção de doenças, e de farmacologia de novas drogas, entre outras. Além disso, é um componente indispensável para a preservação de um genoma completo e a perpetuação dos padrões sanitários e genéticos dos animais (VAJTA; NAGY, 2006). Adicionalmente, estudos visando identificar se a técnica de vitrificação induz alterações fenotípicas embrionárias são necessários para que, se constatados, possam incentivar o aprimoramento da técnica de criopreservação visando obliterar quaisquer fenótipos alterados relacionados com a utilização da técnica.

1.6 Avaliação da viabilidade embrionária pós-vitrificação

O estudo da viabilidade embrionária após o aquecimento é uma forma de avaliação *in vitro* dos métodos de criopreservação. Dentre as técnicas utilizadas para a avaliação *in vitro* pós-descongelamento de embriões criopreservados, podem ser citadas a microscopia de luz, a microscopia eletrônica e a microscopia confocal.

Para a avaliação do desenvolvimento embrionário *in vitro*, utilizam-se a avaliação da taxa de reexpansão da blastocle e o uso de sondas fluorescentes. Essas técnicas são subjetivas e qualitativas, e os padrões utilizados variam de acordo com os pesquisadores. Embriões com qualidade excelente ou boa normalmente geram maiores taxas de prenhez, ao contrário de embriões com baixa qualidade.

A associação das sondas fluorescentes iodeto de propídeo e Hoechst 33342 (corante a base de benzimidazol) compreendem um método quantitativo de avaliação da viabilidade, pois foram inicialmente utilizadas para estimar a quantidade de células vivas e mortas em embriões bovinos produzidos *in vitro*. As células mortas são permeáveis ao iodeto de propídeo e se coram em vermelho ou laranja, já as células vivas possuem membrana celular intacta e se coram pelo Hoechst em azul. Este método permite uma correlação entre as células vivas e mortas, contudo pode ocorrer uma análise subestimada das células mortas se as mesmas estiverem circundadas por células vivas, impedindo a penetração do iodeto de propídeo (GUAITOLINI, 2014).

1.7 A linhagem B6 albino

A linhagem selecionada para os experimentos de vitrificação realizados nesta Dissertação foi a B6(Cg)-*Tyr^{c-2J}*/J, conhecida como B6 albino, uma linhagem co-isogênica mutante espontânea, proveniente do The Jackson Laboratory (EUA), um importante fornecedor de animais de laboratórios na América do Norte. O camundongo dessa linhagem possui uma mutação no gene tirosinase, e os homocigotos para essa mutação possuem a pelagem albina, em vez de negra. Essa linhagem é bastante utilizada para a produção de animais *knock out* (Charles River Laboratory International, EUA; The Jackson Laboratory, EUA). No biotério do INCa, essa linhagem é utilizada para obtenção de imagens e acompanhamento *in vivo* de tumores, com uso de marcadores celulares que emitem fluorescência/bioluminescência, e que podem ser visualizados com auxílio do equipamento IVIS Lumina XR (PerkinElmer, EUA), após anestesia inalatória do animal. Por possuir a pelagem branca, as imagens produzidas são de qualidade superiores àquelas obtidas com animais de pelagem preta (linhagem C57BL/6), pois nesses últimos a cor dos pelos promove absorção de luz, prejudicando a

sensibilidade do equipamento e, conseqüentemente, a definição das imagens obtidas.

Não foram encontrados dados sobre o congelamento de embriões dessa linhagem. Em vista disso e pelo fato de essa linhagem ser de grande importância para as pesquisas em andamento no INCa, optou-se por utilizá-la nos presentes experimentos, contribuindo assim para a produção de informações acerca da vitrificação de embriões dessa linhagem.

Na presente dissertação, com a utilização dos conhecimentos básicos adquiridos por intermédio do Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ, estão descritas de forma sistemática os procedimentos realizados para a implantação do banco de embriões do Biotério do INCa até o mês de junho do ano de 2016, visando a produção de embriões de duas células. Além disso, avaliou-se a eficiência da técnica de vitrificação, assim como a viabilidade dos embriões produzidos e criopreservados em nossas dependências.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de superovulação, manipulação, cultivo e vitrificação de embriões de camundongos visando a implementação de um banco de embriões no biotério de camundongos isogênicos e transgênicos do INCa.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Padronizar o protocolo de indução e a dose hormonal de gonadotrofina sérica da égua prenhe (PMSG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) para a superovulação de camundongos das linhagens BALB/C, C57BL/6, híbridos F1 (C57BL/6 x BALB/C) e OT-I (transgênico) existentes no INCa;
- ✓ Desenvolver as técnicas de obtenção de embriões murinos híbridos (C57BL/6 x BALB/C) existentes no INCa, concebidos *in vivo*, no estágio de duas células;
- ✓ Implementar técnicas de manipulação apropriada de embriões murinos híbridos;
- ✓ Obter e vitrificar embriões de duas células, morfologicamente viáveis, da linhagem B6(Cg)Tyr2J/J (B6 albino) existente no INCa;
- ✓ Comparar a taxa de sucesso no desenvolvimento *in vitro* de embriões de duas células da linhagem B6 albino, coletados a fresco (grupo controle), e após desvitrificação (grupo CrioP), até o estágio de blastocisto;
- ✓ Comparar a viabilidade de embriões da linhagem B6 albino em estágio de blastocisto nos grupos controle e CrioP, por meio de técnicas de coloração, após o cultivo *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e animais

Os experimentos tiveram início em setembro de 2014, estendendo-se até julho de 2016 e foram desenvolvidos no biotério de camundongos isogênicos do Centro de Pesquisas (CPQ) do INCa, localizado na cidade do Rio de Janeiro – RJ. Os experimentos aqui descritos foram aprovados pela CEUA/INCa, com protocolo de aprovação número 002/14. Os animais foram mantidos em sistema de alojamento *individually ventilated cage* (IVC) (BRUMAN *et al.*, 2014) e manejados conforme rotina do biotério. A temperatura ambiente foi de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade relativa entre 45-65% e ciclo de luz/escuridão de 12 horas. A água, esterilizada em autoclave a 121°C por trinta minutos, bem como ração comercial própria para a espécie (Biobase, Brasil), irradiada por feixe de elétrons, foram fornecidas *ad libitum*.

3.2 Desenho experimental

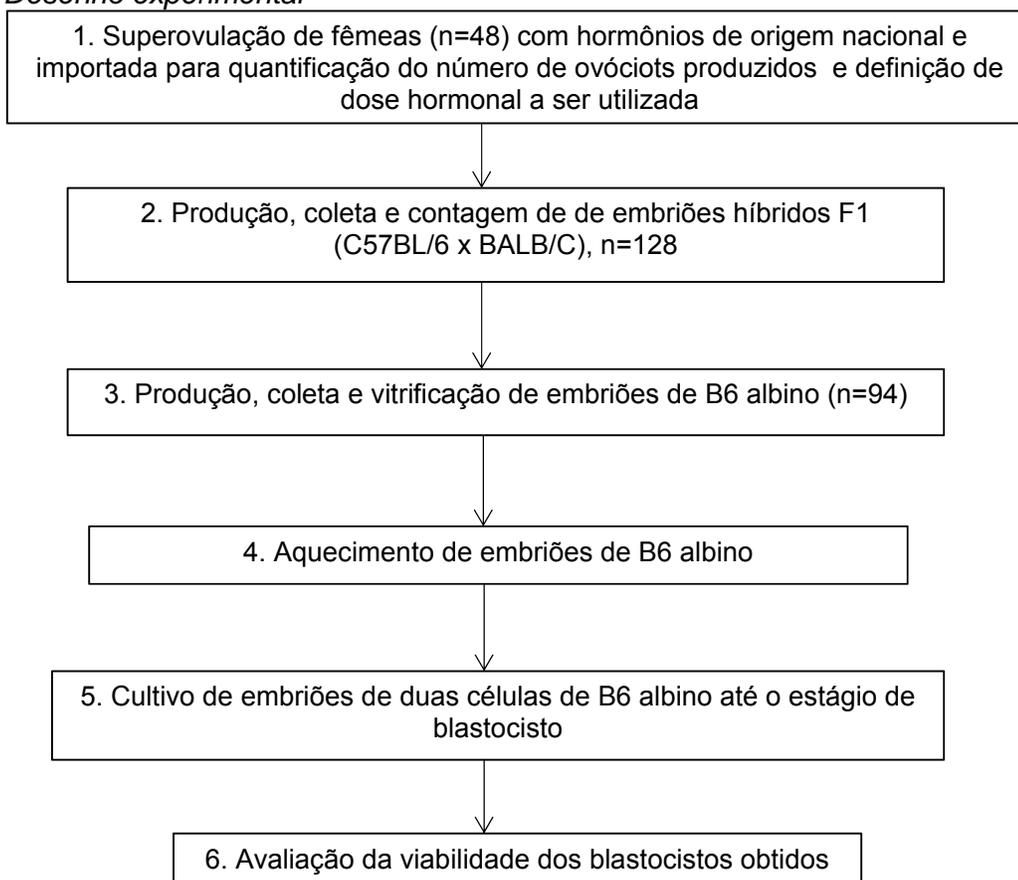


Figura 4: Fluxograma de experimentos desenvolvidos para obtenção e avaliação de embriões.

3.2.1 Superovulação de fêmeas com hormônios de origem nacional e importada para quantificação do número de ovócitos produzidos e definição de dose hormonal a ser utilizada

Com o intuito de se produzir um número maior de embriões por fêmea utilizada, realizamos experimentos de padronização da dose dos hormônios que promovem superovulação. Quarenta e oito fêmeas de camundongos das linhagens Balb/c, C57BL/6, híbridos F1 (C57BL/6 x BALB/C) e transgênicos OT-I (n=6/grupo), entre oito e dez semanas de idade foram superovuladas com 10 UI de PMSG e 48 horas depois tratadas com hCG, ambos hormônios fabricados por uma empresa internacional (Millipore, EUA) e uma empresa nacional (Intervet, Brasil). Ovidutos foram coletados doze horas após o tratamento com hCG e o número de ovócitos foi quantificado. Adicionalmente, para se verificar se uma menor dose (7.5 UI) de PMSG e hCG poderia ser utilizada com a mesma eficácia da de 10 UI, fêmeas Balb/C foram superovuladas com 7,5 ou 10 UI de PMSG e hCG (n=6/grupo), como previamente descrito.

No dia zero foi administrado, via IP (intraperitoneal), o hormônio PMSG a todas as fêmeas, no final da tarde (aproximadamente às 17h). Após 48 horas (dia 2), com o objetivo de promover a ovulação dos folículos previamente desenvolvidos, foi realizada a administração, via IP, do hormônio hCG.

As fêmeas (2 grupos – hormônios PMSG e hCG de marca nacional e importada, n=6/grupo) foram eutanasiadas por deslocamento cervical na manhã do dia seguinte à administração do segundo hormônio (hCG) e em seguida tiveram suas tubas uterinas retiradas, após incisão abdominal, e estendidas em placa de petri estéril (Prolab, Brasil). Foi efetuada a visualização da ampola uterina em lupa estereoscópica (Leica modelo S6D, Alemanha), seguida pela ruptura da mesma com auxílio de agulha 26G, 0,45 x 13mm (BD, EUA), liberando-se os ovócitos e células do cumulus, os quais foram colocados em meio de coleta HTF (*Human Tubarian Fluid*, Irvine Scientific, EUA) adicionado de gentamicina e tampão HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico), comercialmente pronto. A placa foi colocada sobre mesa aquecedora (Bonther, Brasil), a 37°C, até o momento da utilização (CHAVES *et al.*, 2010).

Em paralelo, um macho adulto da linhagem BALB/C foi eutanasiado por deslocamento cervical e, após laparotomia, a cauda do epidídimo e parte do ducto deferente foram retirados e transferidos para uma placa de petri estéril contendo

500µL de meio HTF. Com auxílio de agulha 30G (BD, EUA), romperam-se as estruturas retiradas, a fim de obter os espermatozoides. A placa contendo os mesmos foi mantida em incubadora jaquetada à água a 37°C, e atmosfera constante de 5% de CO₂ (Thermo Scientific, EUA), por 10 minutos. Após observação do sêmen em lupa e visualização da motilidade espermática, coletou-se 10µL do sêmen e transferiu-se esse volume para o meio contendo os ovócitos. A placa foi então incubada a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, pelo tempo mínimo de 2 horas. Esse procedimento permitiu a visualização e quantificação do número de ovócitos, já que os espermatozoides precisam penetrar pelas camadas celulares do cumulus para promover a fertilização. A degradação das células do *cumulus* poderia também ter sido realizada com a adição da enzima hialuronidase, a qual é naturalmente encontrada no acrossoma do espermatozoide, e é responsável pela dispersão das células da *corona radiata*, externa à zona pelúcida. A enzima facilita a dispersão das células do *cumulus*, proporcionando a fertilização. Outro método utilizado para a desnudação do embrião, ou seja, a retirada das células do *cumulus*, é a pipetagem seriada e controlada, com micropipeta de baixo volume e ponteira específica, a fim de que tais células sejam retiradas mecanicamente, contudo esta metodologia apresenta manipulação excessiva do embrião, e conforme elucidado previamente (BLOISE, 2014), a manipulação excessiva do embrião pode acarretar em programação intrauterina. Por este motivo, essa técnica não foi adotada no presente estudo.

3.2.2 Produção, coleta e contagem de embriões híbridos F1

Para a obtenção de embriões *in vivo*, logo após a aplicação do segundo hormônio (hCG), as fêmeas foram acasaladas com machos (uma fêmea para cada macho) da linhagem isogênica C57BL/6 ou B6 albino, com idade mínima de doze semanas, mantidos em sistema de alojamento IVC, e mesmas condições ambientais descritas anteriormente. Na manhã do dia seguinte ao acasalamento, verificou-se o tampão vaginal (ou *plug* vaginal) para confirmação da cópula, sendo este considerado o dia 3 do experimento e o dia 0,5 de gestação.

Experimentos preliminares para obtenção de embriões foram realizados utilizando-se fêmeas da linhagem Balb/C, com idade entre seis e oito semanas (n=128), divididas em grupos de seis animais por experimento, totalizando 16

experimentos. Também foram utilizados 40 machos da linhagem isogênica C57BL/6, com idade mínima de doze semanas, os quais formaram o grupo de reprodutores. Primeiramente, optou-se por produzir embriões híbridos (obtidos pelo cruzamento de animais oriundos de duas linhagens consanguíneas), pois os animais obtidos desse tipo de cruzamento são mais vigorosos, resistentes, e a prole é geralmente maior em número (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002), sendo então oportuno para a implementação das técnicas propostas.

3.2.3 Produção, coleta e vitrificação de embriões de B6 albino

Após padronização das técnicas de superovulação e produção de embriões utilizando-se embriões híbridos (BALB/C x C57BL/6), a colônia de animais inicialmente existente no biotério do INCa foi renovada por matrizes provenientes do The Jackson Laboratory, dos Estados Unidos, as quais chegaram ao biotério em julho de 2015. Desde janeiro de 2016, todos os experimentos voltados à formação do banco de embriões foram realizados com o acasalamento de machos e fêmeas da linhagem B6 albino. Esta conduta objetivou formar um acervo de embriões de linhagem pura, finalidade central de um banco de embriões. A idade das fêmeas da linhagem B6 albino utilizadas, seguindo recomendação de protocolos de vitrificação (HEDRICH, 2012) variou entre 4 e 6 semanas de idade, período no qual considera-se possível obter a melhor resposta na produção de embriões, frente o estímulo hormonal.

Doze horas após a aplicação do segundo hormônio, isto é, hCG, as fêmeas foram observadas quanto à presença do tampão vaginal (massa caseosa de sêmen), indicando que houve a cópula. Este foi considerado o dia 0.5 de gestação. No dia seguinte à visualização do tampão vaginal, dia 1,5 da gestação (E1.5), as fêmeas foram separadas dos machos e em seguida eutanasiadas pelo método de deslocamento cervical. Esse método, apesar de ser aceito com restrição pelo CONCEA (BRASIL, 2009), foi selecionado por causar menos danos aos embriões, como ocorre com a eutanásia realizada por asfixia com CO₂, o qual, por ser um potente vasodilatador, pode promover alteração do tônus vascular, hipotensão severa e diminuição significativa na perfusão tecidual com hipóxia tecidual (TRASLAVINA *et al.*, 2010).

Após a eutanásia, procedeu-se à assepsia local para abertura da cavidade abdominal, incisando-se pele, musculatura e peritônio. Em seguida as tubas uterinas foram retiradas com auxílio de pinça e tesoura de ponta fina esterilizadas, conforme demonstrado na figuras 5 e 6. As mesmas foram colocadas em placa de petri estéril contendo meio HTF e levadas à lupa estereoscópica para lavagem interna (flushing) e obtenção dos embriões.



Figura 5 (esquerda) e 6 (direita): Abertura da cavidade abdominal de fêmeas para retirada das tubas uterinas (A) e posterior coleta dos embriões (B). Disponível em: <http://www.imb.sinica.edu.tw/~leeyinghue/lecture.htm>

Para a lavagem das tubas uterinas, cerca de 0,5 mL de meio HTF foram injetados, com auxílio de agulha 32G, 12mm (Mesalyse, França), sem bixel, pelo infundíbulo. Após uma primeira observação, os embriões foram classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento: uma célula (zigoto ou ovócito não fecundado, já que a lupa utilizada não permitiu uma visualização detalhada do embrião) e duas células. Selecionaram-se os embriões de duas células que apresentaram blastômeros simétricos (em forma de grãos de feijão ou rim – Figura 7), utilizando-se para isso mouth pipette (Sigma-Aldrich Co., EUA) com tubo capilar sem heparina (Precision Glass Line, Brasil) acoplado, previamente estirado em chama. Em seguida, os mesmos foram lavados em três gotas de 35µL de HTF, em placa de petri estéril, e mantidos sobre mesa aquecedora a 37°C, até o momento da vitrificação ou cultivo.

A técnica de criopreservação utilizada no presente estudo foi a de vitrificação de embriões de duas células, pelo fato de que a mesma apresenta menores etapas e necessita de um número menor de reagentes e crioprotetores. O protocolo de vitrificação e desvitrificação utilizado foi adaptado de NAKAO; NAKAGATA; KATSUI (1997), conforme descrito a seguir.

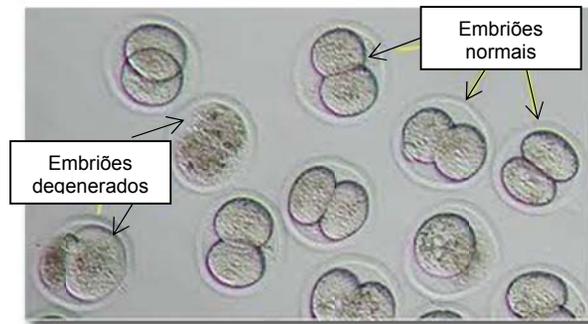


Figura 7: Embriões de duas células demonstrando sinais de degeneração, e embriões normais, com blastômeros simétricos. Fonte: Center for Animal Resources and Development, Kumamoto University).Disponível em: <http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/english/sigen/manual>

Antes de iniciar o procedimento de vitrificação, criotubos de 2mL (Greiner Bio-One, Áustria) foram identificados de acordo com a data do experimento e linhagem criopreservada, e dispostos em *Block Cooler* (Uniscience, Brasil) a uma temperatura de 0°C, aferida com termômetro de imersão tipo espeto (Incoterm, Brasil). Uma solução previamente filtrada (em filtro 0,22 µm, Sarstedt, Alemanha) de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich Co., EUA) 1M em meio HTF foi dispersa em quatro gotas de 100µL em uma placa de petri estéril. Uma gota foi utilizada para lavar os embriões provenientes do meio de coleta (HTF), e as outras para manter os embriões até o momento da vitrificação.

Com auxílio de mouth pipette (Sigma-Aldrich Co., EUA) e capilar, embriões de duas células foram coletados, selecionados, e transferidos para a primeira gota de DMSO 1M. Os mesmos foram lavados e divididos entre as três gotas restantes, de forma que ao final do procedimento cada gota (que correspondeu a um criotubo) contivesse entre 20 e 40 embriões.

Usando uma micropipeta Stripper (Origio, Dinamarca), os embriões contidos em uma das gotas foram transferidos, juntamente com 5µL de DMSO 1M, para dentro de um criotubo disposto no Block Cooler (Uniscience). Após 5 minutos foram adicionados 45µL de solução DAP213 preparado em meio HTF (DMSO 2M, Acetamida 1M, Propilenoglicol 3M, Sigma-Aldrich Co., EUA), onde foram mantidos por mais 5 minutos. Após esse período, os criotubos foram rapidamente transferidos para criocaixa (MVE Chart Industries, EUA) e dispostos em rack, dentro de botijão contendo nitrogênio líquido a -196°C (MVE Chart Industries, EUA), onde permaneceram congelados pelo tempo mínimo estipulado de 24 horas, a fim de

serem avaliados quanto à viabilidade pós-congelamento. As etapas da vitrificação estão ilustradas na Figura 8.

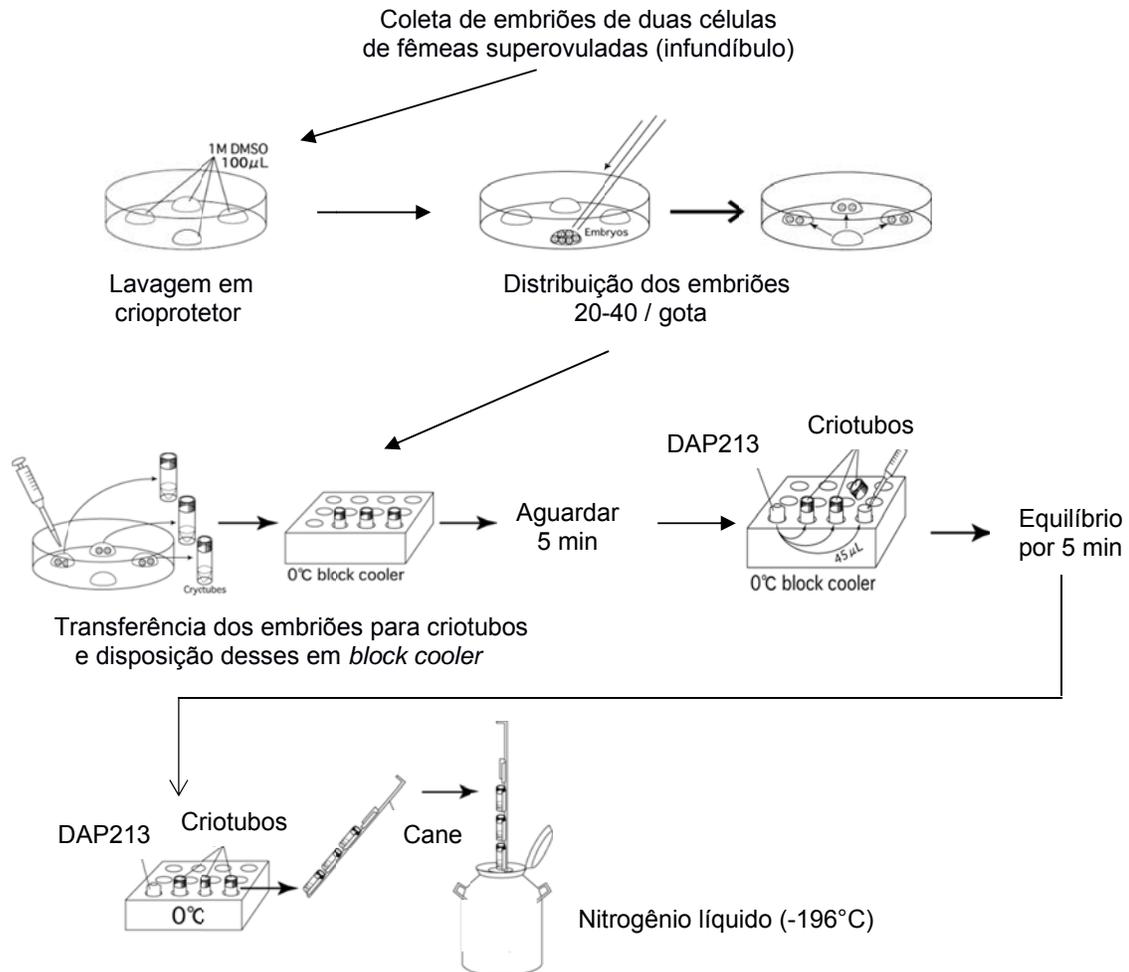


Figura 8. Vitrificação ou congelamento rápido de embriões de camundongos (adaptado de NAKAO; NAKAGATA; KATSUI, 1997). DMSO: dimetilsulfóxido. DAP213: dimetilsulfóxido 2 Molar, Acetamida 1 Molar, Propilenoglicol 3 Molar.

3.2.4 Aquecimento de embriões de B6 albino

Para a desvitrificação dos embriões, o criotubo foi retirado da criocaixa mantida em nitrogênio líquido e deixado por 30 segundos em temperatura ambiente. Após esse período, foram acrescentados 900µL de solução 0,25M de sacarose (Synth, Brasil) preparada em meio para cultivo embrionário contínuo SSM (Irvine Scientific, EUA). A sacarose promove a restituição do equilíbrio osmótico do embrião, favorecendo a entrada de água de forma controlada, já que o mesmo é desidratado durante o processo de vitrificação. O conteúdo foi homogeneizado lentamente por

dez vezes com pipeta automática e ponteira (Gilson Inc., EUA), e em seguida depositado em placa de petri estéril.

Com outra ponteira, foram acrescentados mais 400µL da solução de sacarose 0,25M. Os embriões foram observados, selecionados quanto à aparência (blastômeros simétricos, sem sinais de degeneração celular) e transferidos da solução de sacarose para a primeira gota de uma placa contendo três gotas de 100µL de meio de cultivo SSM, suplementado com 20% de soro sintético SSS (Ingamed, Brasil), mantido previamente ao uso em temperatura de 37°C, e atmosfera com 5% de CO₂. A adição de soro ao meio de cultivo é de fundamental importância, visto que os meios destinados ao cultivo embrionário existentes no mercado não possuem fonte de proteína. Após essa transferência, a placa foi colocada em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Os embriões foram mantidos por 10 minutos na primeira gota, depois lavados na segunda gota e, após transferência para a terceira gota, foram cobertos com óleo mineral (Sigma-Aldrich Co., EUA) e levados à incubadora jaquetada à água, para o cultivo *in vitro* em temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, condições essas que mimetizam o ambiente intra-uterino.

3.2.5 Cultivo de embriões de duas células de B6 albino até o estágio de blastocisto

Com o intuito de se avaliar a viabilidade e sobrevivência dos embriões em estágio de duas células, criopreservados ou não, os mesmos foram divididos em dois grupos, controle e criopreservado (CrioP). Os embriões do grupo controle foram cultivados por 70-72 h, até o estágio de blastocisto (pré-implantacional). Embriões de duas células do grupo CrioP foram aquecidos como descrito anteriormente, e cultivados por 70-72 h até que alcançassem o estágio de blastocisto. O cultivo *in vitro* dos embriões de duas células até o estágio de blastocisto foi realizado em placas de petri estéreis contendo meio SSM suplementado com 20% de soro sintético, em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ e 37°C, condições essas que se mantiveram constantes. A avaliação da viabilidade de blastocistos foi realizada conforme descrito a seguir.

3.2.6 Avaliação da viabilidade dos blastocistos

Os blastocistos obtidos após o cultivo *in vitro*, provenientes tanto de embriões de duas células colhidos a fresco e cultivados (controle), quanto de embriões de duas células vitrificados (CrioP), aquecidos e posteriormente cultivados nas condições citadas anteriormente, foram visualizados com auxílio de lupa estereoscópica em aumento de 40x. Logo após, foram classificados em blastocisto expandido - visualizando-se as duas linhagens celulares, trofoderma e embrioblasto, morfológicamente bem definidas - e em blastocisto eclodido, quando se visualizava ruptura da zona pelúcida e não era mais possível identificar o embrioblasto, segmento do embrião que dá origem ao feto.

Com a finalidade de avaliar se a técnica de criopreservação implementada no biotério estaria comprometendo a viabilidade embrionária no estágio de blastocisto expandido, procedeu-se ao método de coloração descrito por THOUAS *et al.* (2001), o qual foi realizado corando-se diferencialmente as células da massa interna (ICM) ou embrioblasto, e o núcleo das células do trofoblasto dos blastocistos cultivados. Para tal, os embriões foram expostos por 10 segundos à solução 1, constituída por Triton X-100 1% (Sigma-Aldrich Co., EUA) e iodeto de propídeo 100µg/mL (Sigma-Aldrich Co., EUA) preparados em meio MEM (Sigma-Aldrich Co., EUA), e posteriormente fixados na solução 2, contendo 25µg/mL de bisbenzimidazina (Sigma-Aldrich Co.) preparado em etanol 100% (Merck KGaA, Alemanha). Após isso, foram mantidos em placa de petri estéril 35mm de diâmetro (Griner Bio-One, Áustria), a 4°C, em geladeira, *overnight*. Os embriões foram transferidos com *mouth pipette* para uma lâmina (Soledor, Brasil), buscando-se retirar o mínimo possível de volume da solução 2 durante a transferência, e adicionado uma gota de meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, EUA) sob lamínula (Glass Técnica, Brasil). A lâmina foi mantida em local escuro até que pudesse ser visualizada no filtro de excitação de 340-380 nm e emissão de 430 nm, em microscópio de fluorescência (Olympus BX53, dispositivo de fluorescência Olympus U-RFL-T), e fotografados. Após captura das imagens utilizando câmera Olympus DP 72 acoplada ao microscópio, o número de células da massa interna (coradas em rosa ou vermelho) foi contado, bem como os núcleos do trofoblasto (corados em azul) levando-se em conta que os animais utilizados para a produção dos embriões receberam o mesmo tratamento prévio, bem como idêntica manipulação dos blastocistos. O desenvolvimento fetal normal é dependente do número de células do embrião e o

estabelecimento de uma proporção TE:ICM é considerada essencial para assegurar a viabilidade embrionária. Embora não se tenha um parâmetro ideal para esta razão, tem-se adotado como referência valores superiores a uma célula da ICM para duas do TE (SILVA, 2011). Os resultados obtidos nos embriões vitrificados (grupo CrioP, n=6) foram então comparados com os resultados obtidos em embriões não vitrificados (grupo controle, n=6).

3.2.7 Análise estatística

Após o teste de normalidade, diferenças entre o número de ovócitos produzidos após superovulação (10UI) das linhagens BALB/C, C57BL/6, híbridos F1 (C57BL/6 x BALB/C) e transgênicos OT-I foram avaliadas utilizando-se ANOVA de dois fatores, enquanto diferenças entre o número de ovócitos produzidos após superovulação da linhagem Balb/C tratados com 7.5UI de PMSG e hCG foram avaliadas utilizando-se o Teste T de Student. Diferenças entre o número de células ICM e trofodérmicas nos grupos controle e CrioP foram analisadas pelo Teste de Mann-Whitney (teste não-paramétrico). Os cálculos foram realizados no software GraphPad Prism® (Graphpad Software, Inc., USA). Os valores foram representados como média \pm s.e.m (erro padrão da média) com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização de protocolo hormonal de superovulação murina

Camundongos das linhagens BALB/C, C57BL/6, híbridos F1 (C57BL/6 x Balb/C) e transgênicos OT-I foram superovulados com 10 UI de PMSG e hCG. ANOVA de dois fatores acusou que não houve diferenças estatísticas entre o número de ovócitos produzidos utilizando-se hormônios das marcas Millipore e Intervet, respectivamente, na linhagem C57BL/6 ($16,5 \pm 5,9$ e $11,7 \pm 4,5$), bem como na linhagem BALB/C ($18,0 \pm 6,1$ e $26,6 \pm 17,8$). De modo similar, não houve diferenças estatísticas entre o número de ovócitos produzidos por híbridos F1 (C57BL/6 x BALB/C) utilizando-se hormônios das marcas Millipore ($17,7 \pm 5,6$) e Intervet ($11,0 \pm 7,0$), assim como na linhagem transgênica OT-I ($26,80 \pm 16,7$ e $23,5 \pm 18,5$, respectivamente), conforme ilustrado na Figura 9. Adicionalmente, foi investigado se uma dosagem menor de PMSG e hCG (7,5UI), seria capaz de induzir uma resposta superovulatória similar ao regime de 10UI, em fêmeas Balb/c. Não observou-se diferenças entre o número de ovócitos produzidos com o regime de 7.5UI ($28,4 \pm 7,79$) quando comparado aos resultados obtidos após estímulos com 10UI ($32,6 \pm 5,98$) (Figura 10). Portanto, consideramos que a dose de 7,5 UI seria apropriada como regime de superovulação e a mesma foi utilizada nos posteriores experimentos. A figura 11 ilustra os ovócitos coletados após estímulo hormonal.

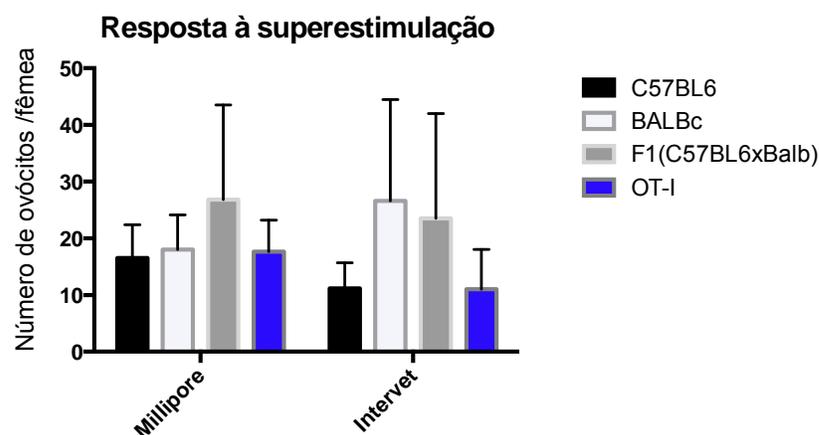


Figura 9 – Resposta à superovulação induzida após estímulo com 10 UI de PMSG e de hCG. ANOVA de dois fatores (média \pm s.e.m).

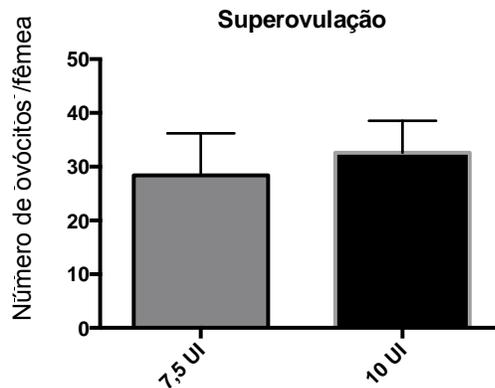


Figura 10 – Resposta à superovulação induzida após estímulo com 7,5 e 10 UI de PMSG e de hCG (marca Intervet) em fêmeas Balb/c. Teste T de Student (média ± s.e.m).

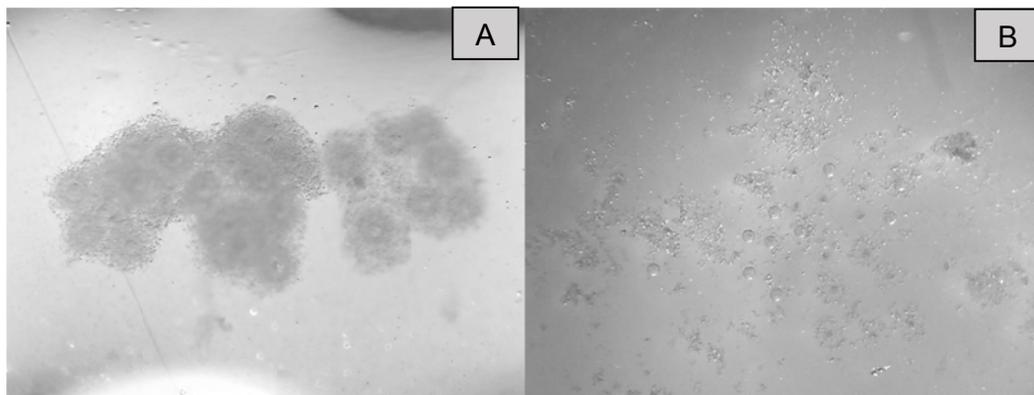


Figura 11 – Ovócitos obtidos em camundongos fêmeas da linhagem Balb/c após superovulação com 7,5 UI de PMSG e de hCG. (A) Ovócitos com células do *cumulus ooforus*; (B) Ovócitos visualizados separadamente, com células do *cumulus* já digeridas, após quatro horas em contato com espermatozoides. Aumento de 40x.

4.2. Padronização da produção e coleta de embriões murinos híbridos

Nos experimentos iniciais, ocorridos entre os meses de outubro de 2014 e novembro de 2015, padronizou-se a técnica de produção de embriões, utilizando-se híbridos de duas linhagens isogênicas (BALB/C x C57BL5). Os dados apresentados na Tabela 4 descrevem a quantidade de ovócitos/embriões de uma célula e de embriões de duas células visualizados e coletados. A Tabela 4 demonstra também o número de blastocistos cultivados in vitro por um período de 70-72 horas, e avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento (expandido ou eclodido). As Figuras 12 e 13 representam os ovócitos e/ou embriões visualizados em lupa estereoscópica e a Figura 14 ilustra os blastocistos obtidos após cultivo de embriões híbridos de duas células.

Tabela 4: Resultados obtidos nos experimentos de superovulação, coleta e cultivo de embriões híbridos de camundongos (C57BL/6 x Balb/c, n=8).

Parâmetros avaliados	Total (n)	Taxa de sucesso (%)
Nº de fêmeas acasaladas	128	---
Fêmeas com tampão vaginal (incluídas)	111	87%
Nº total de estruturas visualizadas (ovócitos/embriões de uma célula e embriões de duas células)	870	---
Nº de embriões de uma célula ou ovócitos	532/870	61%
Nº de embriões de duas células coletados e cultivados	338/870	39%
Nº total de blastocistos	222/338	66%
Nº de blastocistos expandidos	163/222	73%
Nº de blastocistos eclodidos	59/222	27%



Figura 12 – Zigotos, ou ovócitos não fertilizados, obtidos 36 horas depois da administração do hormônio hCG e acasalamento (dia 1.5 de gestação). Aumento de 40x.



Figura 13 – Embriões obtidos do acasalamento de duas linhagens isogênicas (híbridos), de duas células, obtidos após superovulação. Para avaliação da qualidade dos embriões de duas

células, o principal aspecto levado em consideração foi a simetria dos blastômeros, bem como a integridade da zona pelúcida e a ausência de sinais de degeneração, como retração citoplasmática e formação de grânulos. Aumento de 40x.

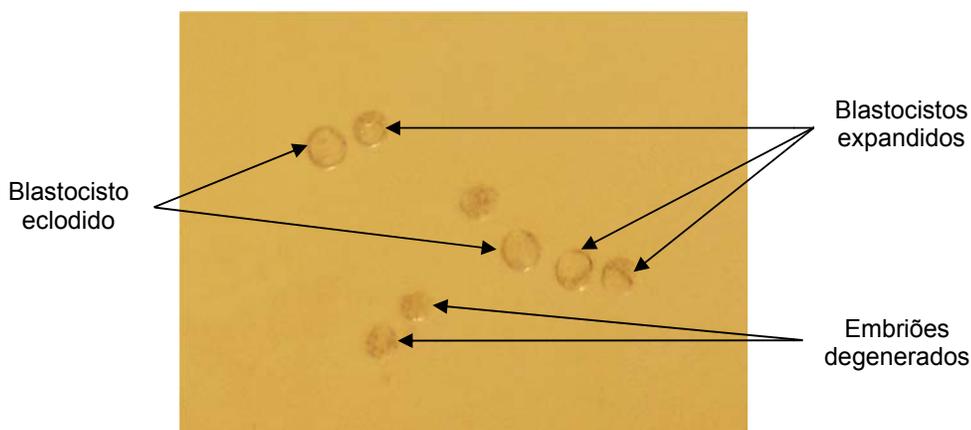


Figura 14: Blastocistos em diferentes graus de desenvolvimento. Após a obtenção dos embriões híbridos de duas células, os mesmos foram cultivados *in vitro* por um período de 70-72 horas, e avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento. Aumento de 40x.

4.3 Produção e vitrificação de embriões da linhagem B6 albino visando a formação do banco de embriões

Após a padronização das técnicas de superovulação, produção e cultivo de embriões utilizado embriões híbridos (BALB/C x C57BL/6), camundongos B6(Cg)Tyr2J/J (B6 albino, n=94) foram submetidos às etapas de superovulação, coleta, vitrificação, aquecimento e cultivo de embriões visando a implementação do banco de embriões no biotério do INCa. Os resultados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Dados obtidos da coleta, congelamento, aquecimento e cultivo de embriões da linhagem B6(Cg)Tyr2J/J (B6 albino, n=94) entre os meses de janeiro e junho de 2016.

Parâmetros avaliados	Total (n)	Taxa de sucesso (%)
Nº de fêmeas acasaladas	94	---
Fêmeas com tampão vaginal (incluídas)	90/94	96%
Nº total de estruturas visualizadas (ovócitos/embriões de uma célula ou embriões de duas células)	821	---
Nº de embriões de uma célula ou ovócitos	280/821	34%
Nº de embriões de duas células coletados	541/821	66%
Nº de embriões de duas células vitrificados	375/541	69%
Nº de embriões perdidos durante o processo	166/541	---

continua

conclusão

Parâmetros avaliados	Total (n)	Taxa de sucesso (%)
Nº de embriões de duas células aquecidos e cultivados	368/375	98%
Nº de embriões perdidos durante o processo	7/375	2%
Nº total de blastocistos	42/368	11%
Nº de blastocistos expandidos	36/42	86%
Nº de blastocistos eclodidos	6/42	14%

4.4 Eficiência da técnica de vitrificação de embriões B6 albino pós-aquecimento

Com o intuito de avaliar se a técnica de vitrificação implementada no biotério do INCa produziu um número significativo de blastocistos viáveis, comparamos as taxas de formação de blastocistos (expandidos e eclodidos) de embriões em estágio de duas células não vitrificados (controle) e vitrificados/criopreservados (CrioP), como demonstrado na Tabela 6. A Figura 15 apresenta os blastocistos expandidos e eclodidos dos grupos controle e CrioP visualizados em lupa estereoscópica.

Tabela 6: Eficiência da técnica de vitrificação de embriões. Embriões de duas células obtidos a fresco (Controle) ou aquecidos pós-vitrificação (CrioP) foram cultivados por 70-72 h até atingirem o estágio de blastocisto.

Parâmetros avaliados	Grupo Controle (C)	Taxa de sucesso (C)	Grupo CrioP	Taxa de sucesso (CrioP)
Nº de embriões de duas células	198	---	368	---
Nº total de blastocistos	153/198	77,27%	42/368	11,41%
Nº de blastocistos expandidos	126/153	82,35%	36/42	85,71%
Nº de blastocistos eclodidos	27/153	17,65%	6/42	14,29%

4.5 Avaliação da viabilidade embrionária pós-aquecimento

Embriões de duas células foram alocados nos grupos controle ou CrioP (n=6/grupo) e cultivados *in vitro* até a fase de blastocisto expandido. O número de células da massa celular interna (embrioblasto) e do trofoblasto foram quantificadas.

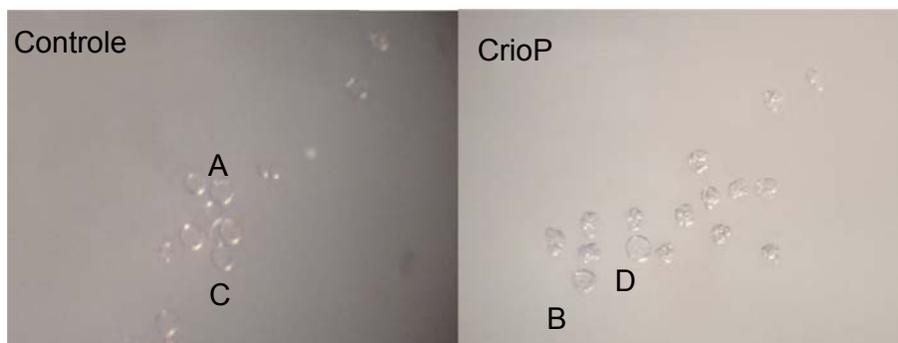


Figura 15: Blastocistos expandidos (A e B) e eclodidos (C e D) dos grupos controle e CrioP, respectivamente, após cultivo *in vitro* de embriões em estágio de duas células, por um período de 70-72 horas. Aumento de 40x.

Não houve diferença no número das duas populações celulares em blastocistos oriundos de embriões do grupo CrioP quando comparados a blastocistos do grupo controle (Tabela 7), assim como na relação TE:ICM. A Figura 16 representa os blastocistos expandidos dos grupos controle (A) e CrioP (B), visualizados, fotografados e quantificados por microscopia de fluorescência.

Tabela 7: Número de linhagens celulares em blastocistos expandidos, derivados dos grupos controle (n=6) e CrioP (n=6). Teste de Mann-Whitney

Grupos	Embrioblasto-ICM (Nº de células)	Trofoderma-TE (Nº de células)	TE:ICM
Controle (C)	7 (\pm 1,6)	16 (\pm 4,3)	2,4 (\pm 0,2)
CrioP	10 (\pm 2,1)	23 (\pm 2,8)	2,4 (\pm 0,2)
P value	0,164	0,058	0,48

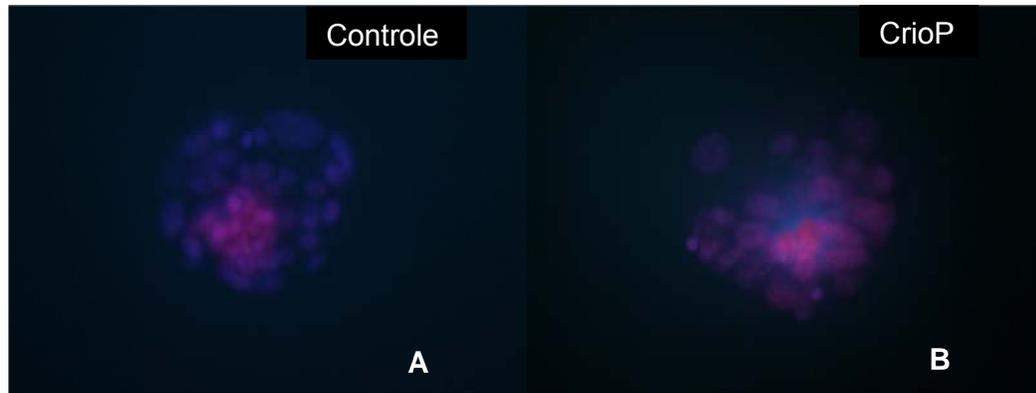


Figura 16: Blastocistos expandidos do grupo controle (A) e CrioP (B) após cultivo *in vitro* desde o estágio de duas células até blastocisto, por um período de 70-72 horas, após coloração diferencial, e visualização à microscopia de fluorescência. As células do embrioblasto estão coradas de rosa, enquanto as do trofoblasto estão coradas de azul. Aumento de 200x.

5. DISCUSSÃO

Em conformidade com os objetivos enumerados nesta Dissertação, definiu-se a dose hormonal para a superovulação de fêmeas, bem como a técnica de criopreservação/vitrificação de embriões para a linhagem B6 albino. A técnica de coloração diferencial de células da ICM e TE permitiu constatar que o protocolo de vitrificação utilizado não interferiu na viabilidade embrionária, demonstrando assim a eficácia do procedimento para a formação do banco de embriões proposto.

5.1 Eficiência na superovulação de fêmeas de camundongos

A dose de 10UI dos hormônios PMSG e hCG foi eficaz em induzir a superovulação de fêmeas de diferentes linhagens isogênicas, enquanto a dose de 7.5 UI foi eficaz em produzir a mesma resposta ovulatória, comparada a 10UI, em fêmeas Balb/c. As doses de 7,5 e 10UI dos hormônios PMSG e hCG encontram-se dentro do intervalo preconizado para aplicação, visando a obtenção de embriões murinos por meio da superovulação de fêmeas com obtenção de máxima resposta. Essa dose difere, geralmente, de acordo com a idade dos animais utilizados, ou seja, quanto maior a idade, maior a dose hormonal, a qual varia entre 2.5 e 10UI, para animais entre 3 e 8-10 semanas de idade, respectivamente (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; BAPTISTA; LANGE; RODRIGUES, 2005, ROSSI *et al.*, 2011). Além desses parâmetros, deve-se levar em consideração as condições macro e microambientais em que vivem os animais e o sistema de manejo, incluindo o sanitário. Contudo, no nosso contexto, tais condições foram as mesmas para todos os animais investigados.

Com relação à produção embrionária pós superestimulação, deve-se atentar para o intervalo mínimo de cinco dias, necessário entre os acasalamentos, para que o macho possa ter sua produção de espermatozoides normalizada para a próxima monta. Outro critério a ser considerado é o fator genético. Como cada linhagem de camundongos possui aspectos reprodutivos peculiares, é imprescindível que se faça a padronização da dose hormonal *in loco* para diferentes linhagens, a fim de se obter o máximo desempenho para a produção embrionária. Além do fator genético, a resposta à superovulação varia tanto com a idade quanto com o peso, condição

nutricional, sanidade animal e condições de alojamento das fêmeas (MARTÍN-COELLO *et al.*, 2008).

A escolha por hormônio de fabricação nacional, no lugar de um importado – haja vista que o primeiro apresentou resultados semelhantes no número de ovócitos obtidos quando comparado ao último – permite o rápido acesso ao produto. A aquisição do hormônio fabricado fora do país pode levar até seis meses desde o pedido até a entrega, o que demanda uma excelente gestão de compras, a fim de que a rotina de obtenção e congelamento de embriões não seja prejudicada. Além disso, o custo de hormônios de fabricação nacional é cerca de dez vezes menor em relação ao de um importado, o que por si só já configura motivação suficiente para a escolha do produto nacional.

Apesar de terem sido testadas linhagens distintas na padronização da dose hormonal para superovulação, é prudente que, a cada nova linhagem adquirida pelo biotério, testes sejam realizados em diferentes doses, e com animais de diferentes idades, a fim de que seja implementado o protocolo mais eficiente, como preconizado pela literatura (BORTOLATTO *et al.*, 2012).

5.2 Produção de embriões híbridos x embriões de linhagens puras isogênicas

Para a implementação do banco de embriões do biotério do INCa, foi necessário padronizar a obtenção, coleta e cultivo *in vitro* de embriões. Para tanto, utilizamos embriões híbridos, provenientes do acasalamento entre duas linhagens isogênicas (BALB/C x C57BL/6) já que animais híbridos possuem melhores taxas de sobrevivência quando comparados a animais de linhagens puras, isogênicas (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Nosso objetivo era produzir embriões com melhores chances de sobrevivência após coleta. Entretanto, o número de embriões inicialmente coletados foi baixo, devido à falta de conhecimento da técnica, nunca antes efetuada no biotério. Ao longo dos experimentos, verificou-se uma taxa de sucesso superior no número de embriões coletados (dados não demonstrados), demonstrando uma melhoria na habilidade de aquisição e manipulação desses embriões, fato esse que se manteve com a produção de embriões de linhagem pura B6 albino. Inicialmente, a taxa de produção total de blastocistos de linhagem híbrida foi de 66%, enquanto a de embriões isogênicos foi de 77%. Portanto, não é possível demonstrar relação, com os procedimentos descritos nessa Dissertação, quanto a

linhagem animal ou o tipo de embrião gerado (híbrido x isogênico), como sendo responsáveis pelo maior ou menor número de embriões produzidos, ou se o aumento em torno de 11% na produção de embriões isogênicos ocorreu devido a uma melhor manipulação e execução das técnicas de captação e cultivo de embriões.

Paralelamente, a taxa de coleta de embriões de uma célula (zigoto) ou de ovócitos não fertilizados – já que com o equipamento disponível em nosso laboratório não foi possível diferenciar os dois tipos celulares, devido ao aumento máximo de 40x – foi ainda alta, 61% em embriões híbridos e 34% na linhagem isogênica B6 albino; quando comparada a outros trabalhos, que indicam taxas de 3 a 17% (THORAT; INGLE, 2012). Novamente, observou-se uma melhoria quanto ao sucesso na obtenção de embriões de duas células (observada pela diminuição do número de ovócitos/embriões de uma célula), com o passar dos experimentos. Contudo, ainda é necessário otimizar a coleta de embriões de duas células, buscando-se verificar se os resultados obtidos estão relacionados à linhagem, ao hormônio utilizado, ao status sanitário e/ou manejo dos animais na criação, bem como a falhas na aplicação dos hormônios, ao horário de administração dos mesmos, ou ao horário de coleta dos embriões. Pretendemos alcançar essa melhoria ao longo do tempo em nosso biotério.

5.3 Congelamento rápido de embriões

Nos experimentos realizados visando o estabelecimento do banco de embriões, efetuamos superovulação com subsequente cópula e recuperação de embriões no estágio de duas células para serem criopreservados. A relativa baixa taxa na recuperação de embriões pós-fertilização (66%) pode estar relacionada a um estresse térmico, capaz de gerar um efeito negativo na resposta superovulatória de fêmeas. Experimentos realizados em ratos demonstraram que as células da granulosa possuem menos expressão de receptores de gonadotrofinas, maior tendência a apoptose, além de reduzida atividade esteroidogênica quando a superovulação é realizada nos meses quentes do ano (SHIMIZU *et al.*, 2005). Portanto, uma vez comprometida a resposta superovulatória, o número de embriões recuperados é, por sua vez, reduzido. A faixa de temperatura em nosso sistema de criação e laboratório é constante, variando entre 20 e 22°C. Não foram observadas

alterações na temperatura de nossas dependências durante o percurso dos experimentos. Com o objetivo de se elucidar essa questão, faz-se necessário a realização de futuros testes de superovulação e recuperação embrionária em diferentes meses do ano, para verificar se existe diferença significativa que denote influência da temperatura ambiental sazonal na produção oocitária.

A técnica selecionada para a criopreservação de embriões descrita por NAKAO; NAKAGATA; KATSUI (1997) foi por nós adaptada e demonstrou ser rápida, de fácil manuseio, e a um custo satisfatório, características significativas para uma instituição pública de pesquisa.

Trabalhos relatam uma taxa de sucesso na obtenção de blastocistos cultivados de embriões previamente criopreservados por essa técnica da ordem de 51 e 69% (THORAT; INGLE, 2012; ZHANG *et al.*, 2009), similar ao resultado obtido de embriões que não passaram pela etapa de congelamento. A taxa de blastocistos totais obtidos em nossos experimentos foi baixa, 11,4% quando comparada com a taxa de blastocistos não vitrificados (aproximadamente 77%). Logo, pretendemos otimizar a técnica, principalmente nas etapas de pré-vitrificação (contato do embrião com o crioprotetor DMSO) e vitrificação (contato do embrião com a mistura de crioprotetores DMSO, acetamida e propilenoglicol), nas quais a temperatura constante de 0°C é crítica, e variações na temperatura durante esse estágio pode resultar na baixa eficiência do procedimento. A temperatura durante o procedimento de vitrificação foi verificada com termômetro de imersão do tipo palito, devidamente calibrado, porém com um erro de leitura de $\pm 1^\circ\text{C}$, o qual não deve ser desconsiderado já que, de acordo com o protocolo, a temperatura não deve variar durante a adição do crioprotetor DAP213. Todos os experimentos foram realizados quando o termômetro marcava entre 0 e 1°C. Entretanto, devido ao erro do instrumento, a mesma pode não ter sido adequada. Com a intenção de retirar esse viés, pretendemos adquirir um termômetro de maior precisão, que apresente um menor erro de leitura, garantindo, desta forma, que a pré-vitrificação seja realizada a temperatura de 0°C.

5.4 Viabilidade de embriões congelados, aquecidos e cultivados

Como previamente discutido, as taxas de recuperação de embriões de duas células vitrificados e posteriormente aquecidos e cultivados mostraram-se baixas

(11%), quando comparadas a outras publicações, que apresentam taxas variando entre 51 e 69% (THORAT; INGLE, 2012; ZHANG *et al.*, 2009).

Essa diferença poderia ter ocorrido por diversos fatores, como por exemplo a linhagem utilizada. Como dispusemos apenas da linhagem B6 albino para os experimentos, devido à grande demanda de uso de outras linhagens de camundongos nos projetos de pesquisa desenvolvidos no INCa, não foi possível estabelecer se uma maior taxa de sucesso no desenvolvimento de embriões até o estágio de blastocisto seria possível com outras linhagens. Não foram encontradas publicações que descrevessem as taxas de recuperação e de desenvolvimento embrionário para a linhagem estudada nessa Dissertação.

Além disso, observamos que após uma mesma bateria de vitrificação, isto é, de embriões coletados em um mesmo momento, provenientes de fêmeas superovuladas e manejadas em iguais condições, observavam-se morfologias diferentes ao aquecimento. Observaram-se embriões degenerados, ou outros classificados como normais, porém sem desenvolvimento até o estágio de blastocisto quando cultivados, conforme inicialmente esperado (dados observacionais). Como os embriões são reunidos ao acaso após a coleta e seleção (n=6 fêmeas/experimento), na proporção de 20-40 embriões por criotubo para serem posteriormente vitrificados, é possível que alguns desses embriões não apresentem morfologia adequada para um pleno desenvolvimento – a lupa utilizada em nossa rotina possui aumento máximo de 40x, o que impossibilita uma visualização acurada da zona pelúcida ou presença/ausência de granulação intracelular – ou que os mesmos apresentassem um fenômeno conhecido como “fase de bloqueio de duas células” (ZHANG *et al.*, 2009). Nessa, embriões de duas células são cultivados e, mesmo após 72h mantidos em condições ótimas de desenvolvimento, permanecem com os blastômeros intactos, e mesma morfologia inicial, o que sugere que o congelamento de embrião em estágio de duas células, apesar de amplamente praticado e documentado, possa não ser o ideal, e novas estratégias, como o congelamento de embriões de quatro a oito células, proporcionem melhores taxas de sucesso.

5.5 Viabilidade de embriões por meio de coloração diferencial de blastocistos

THOUAS *et al.* (2001) descreve uma proporção média ICM:TE de 2,6 para blastocistos viáveis provenientes de embriões de duas células, e cultivados até o estágio de blastocisto. Os resultados obtidos nos experimentos realizados, 2,4 para ambos os grupos controle e CrioP, demonstram que a técnica de vitrificação selecionada é capaz de fornecer embriões com potencial gerador de fetos, sendo considerada, portanto, eficaz para a formação do banco de embriões murinos pretendido. Também demonstra que mesmo apresentando uma baixa taxa de formação de blastocistos, a presente técnica desenvolvida em nossas dependências produz blastocistos viáveis.

Como somente a linhagem B6 albino foi utilizada nos experimentos, faz-se necessário padronizar a técnica também para as outras linhagens criadas no biotério do INCa, a fim de garantir que essa possua a mesma eficácia observada. Do contrário, deverão ser implementadas técnicas diversas da relatada nessa Dissertação, que sigam protocolos validados e atendam à demanda por linhagem de camundongo.

A técnica de coloração descrita por THOUAS *et al.*, 2001, e utilizada em nossos experimentos, apesar de ser eficaz para contagem de células da massa celular interna e trofoectoderma, mostra-se dispendiosa, já que os reagentes são caros e as soluções possuem validade de quinze dias após preparo. Contudo, demonstrou ser uma excelente técnica indireta para se avaliar o potencial gerador de fetos dos blastocistos do grupo CrioP.

É sabido que embriões provenientes de técnicas de reprodução assistida (ART) geram fetos com menor peso ao nascimento (BLOISE *et al.*, 2014). Em humanos, verificou-se que quase 34% dos recém-nascidos concebidos por ART nasceram com peso menor de 2500g, sendo que quase 14% destes recém-nascidos tiveram seu peso abaixo de 1500g (FREITAS *et al.*, 2008).

Como meta futura, pretendemos realizar transferência embrionária para fêmeas pseudoprenhes por meio de cirurgia (incisão dorso-lateral, na altura daloja renal, para acesso ao útero), implantando pelo infundíbulo embriões em estágio de duas células, que tenham sido previamente vitrificados. A constatação da prenhez é a forma mais eficaz de demonstrar o sucesso da técnica de vitrificação selecionada, além de garantir que o banco de embriões murinos inicialmente constituído serve de

fato como um repositório de animais, em caso de acidentes e/ou contaminações indesejadas.

6. CONCLUSÃO

A técnica de vitrificação selecionada para a formação de um banco de embriões murino no biotério do INCa, apesar de apresentar baixa taxa de sucesso em relação ao esperado, é capaz de fornecer embriões com aptidão para a produção de fetos. De acordo com os resultados apresentados na coloração diferencial com iodeto de propídeo e bisbenzimidida, não existe diferença significativa na razão entre o número de células do trofoectoderma e da massa celular interna (TE:ICM), de embriões obtidos a fresco (grupo controle) comparando com embriões vitrificados e posteriormente aquecidos. Melhorias na eficiência da técnica de vitrificação de embriões em futuros experimentos ainda podem ser implementadas. A padronização das técnicas de produção de embriões e vitrificação também será estendida para outras linhagens utilizadas no INCa, a fim de que seja possível o estabelecimento de um banco de embriões.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Inicialmente, objetivamos aumentar a taxa de obtenção de blastocistos a partir de embriões de duas células vitrificados e posteriormente aquecidos e cultivados. Serão avaliados de forma mais minuciosa possíveis falhas na utilização de meios de cultivos (com testagem de diferentes meios e diferentes percentuais de suplementação proteica), condições de manipulação dos embriões durante o congelamento (temperatura e tempo críticos na manipulação de embriões e crioprotetores) e de cultivo até o estágio de blastocisto (homogeneidade quanto à temperatura e percentual de atmosfera de CO₂), além da avaliação das condições sanitárias e genéticas dos animais utilizados.

Após atingirmos taxas de sucesso mais altas na obtenção de blastocistos pós-cultivo, embriões vitrificados e aquecidos serão implantados em fêmeas pseudoprenhes para observação da gravidez. Inicialmente, a ninhada será avaliada, comparando-se o número de embriões implantados x número de filhotes nascidos vivos, além de estudarmos peso e desenvolvimento dos filhotes pós-nascimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, J., SHELTON, J. N. **Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos**. Journal of Reproduction and Fertility; 98:459-465, 1993.

ALMIÑANA, C., CUELLO, C. **What is new in the cryopreservation of embryos?** Animal Reproduction. Jul./Sept.; v.12, n.3, p.418-427, 2015.

AMSTISLAVSKY, S. *et al.* **Embryo cryopreservation and in vitro culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*)**. Theriogenology. 1;83(6):1056-63, 2015.

ANDRADE, A., PINTO, S. C., OLIVEIRA, R. S. (organizadores). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388p.

ARAV, A., SHEHU, D., MATTIOLI, M. **Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes**. Journal of Reproduction and Fertility; 99:353-8, 1993.

ARAV, A. **Cryopreservation of oocytes and embryos**. Theriogenology; 81:96-102, 2014.

BAPTISTA, L. P. C.; LANGE, M. C.; RODRIGUES, J. L. **Variabilidade na produção de embriões de *Mus domesticus domesticus***. ARS VETERINARIA, Vol. 21, n. 1, p. 101-108, 2005.

BARBOSA, R. T. *et al.* **Avanços Tecnológicos da Criopreservação de Ovócitos**. Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais, v. 1, n. 4, p. 32 - 35, 2009.

BLOISE, E. *et al.* **Impaired placental nutrient transport in mice generated by in vitro fertilization**. Endocrinology; 153(7):3457-67, 2012.

BLOISE E., FEUER, S. K., RINAUDO, P. F. **Comparative intrauterine development and placental function of ART concepti: implications for human**

reproductive medicine and animal breeding. Human Reproduction Update. Nov-Dec;20(6):822-39, 2014.

BORTOLATTO, J. *et al.* **Núcleo de desenvolvimento em fertilização in vitro. I. Estudo da resposta à superovulação e viabilidade embrionária.** RESBCAL, v.1 n.1, p. 14-23, 2012.

BRAGGIO, M. M.; MARTINS, A. R. S.; VALERO, V. B. **Influência do manejo na produtividade e no desenvolvimento de camundongos (*Mus musculus*).** Arquivos do Instituto Biológico, 70 (2):169-173, 2003.

BRASIL. Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009. **Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e Caracterização de biotérios - CONCEA, estabelece normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Histórias da oncologia clínica no Instituto Nacional de Câncer: INCA.** Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro: INCA, 2008. 110p.: il. color.

BRUMAN, O. *et al.* **The effect of two different Individually Ventilated Cage systems on anxiety-related behaviour and welfare in two strains of laboratory mouse.** Physiology & Behavior, v. 124, 92-99, 2014.

CARVALHO, A. A., *et al.* **Vitrificação: uma alternativa para preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos.** Acta Veterinária Brasília; 5(3): 236-248, 2011.

CECAL/ Centro de Criação de Animais de Laboratório. **Biotecnologia**. Disponível em: <http://www.cecal.fiocruz.br/content/biotecnologia>. Acessado em 03 de maio de 2016.

Center for Animal Resources and Development, Kunamoto University. **Procedure for Warming of Vitrified Embryos**. Disponível em: <http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/english/sigen/manual/> Acessado em 01 de junho de 2016.

CHAVES, R. N. *et al.* **Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.34, n.1, p.37-49, jan./mar. 2010.

DOBRINSKY, J. R. **Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos**. Theriogenology, v.57, p.285-302, 2002.

EXPERIMENTAL SYSTEM VIDEOS. **Collecting the oviducts from mouse abdominal cavity; Collecting mouse embryos from oviducts**. Disponível em <http://www.imb.sinica.edu.tw/~leeyinghue/lecture.htm>. Acessado em 21 de janeiro de 2017.

FERRO, E.S. **Biotecnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos intracelulares**. Estudos Avançados, v.24, n.70, p.. São Paulo, 2010.

GARDNER, D. K. (editor) *et al.* **Textbook of Assisted Reproductive Techniques**. CRC Press. 4a edição, v.1, p.310. Estados Unidos, 2012.

GODARD, A. L. B. **A Clonagem Posicional – uma abordagem para o estudo do genoma funcional**. Monografias SBG, Ribeirão Preto: SBG, 151 p., 2008.

GORDON, I. **Storage and cryopreservation of oocytes and embryos**. In: Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CAB International, p.293-328, 1994.

GUAITOLINI, C. R. de F. **Efeitos da congelação lenta e da vitrificação na viabilidade, ultraestrutura e expressão gênica de embriões caninos produzidos “in vivo”**. 2014. 110 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Jaboticabal.

HEDRICH, H. J. (editor). **The Laboratory Mouse**. Elsevier. Segunda edição, p. 682. Estados Unidos, 2012.

HOLT, W. V. **Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences**. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.

LEIBO, S. P. **Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis**. *Theriogenology*, v.69, p.37-47, 2008.

LUCCI, C. M. *et al.* **Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue**. *Theriogenology*, v.61, p.1101-1114, 2004.

MARTÍN-COELLO, J. *et al.* **Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*)**. *Theriogenology*, v. 70, p. 1004–1013, 2008.

MAZUR, P. **Freezing of living cells: mechanisms and implications**. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, v.247, p.125-142, 1984.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Conhecendo o Biotério (impresso)**. Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica – Instituto Nacional de Câncer. 2012.

MOCHIDA, K. *et al.* **Cryopreservation of Mouse Embryos by Ethylene Glycol-Based Vitrification**. *Journal of Visualized Experiments*. 2011; (57): 3155.

MOUSSA, M. *et al.* **Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives.** Science China, v.57, p.903-914, 2014.

NAKAO, K.; NAKAGATA, N.; KATSUKI, M. **Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos.** Experimental Animals 46(3):231-4, 1997.

NEVES, S. M. P., MANCINI FILHO, J., MENEZES, E. W. de (editores). **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP.** FCF-IQ/USP, São Paulo, p. 50, 2013.

NIEMANN, H. **Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs.** Theriogenology; 35:109-24, 1991.

PAPADOPOULOS, S. *et al.* **Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts.** Animal Reproduction Science, v.74, p.35-44, 2002.

PIASSI, L. M. *et al.* **Efeito de crioprotetores impermeáveis sobre a viabilidade in vitro de espermatozoides congelados de camundongos (*Mus musculus*) das linhagens Swiss-Albina e BALB/C.** Ciência Animal Brasileira, v. 10, n. 4, 2009.

REICHENBACH H. *et al.* **Transferência e criopreservação de embrião bovino.** In: Gonçalves P.B., Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** São Paulo: Varela, 2002. p.127-178.

ROSSI, L. M. *et al.* **Ação dos medicamentos para estimulação ovariana sobre a primeira geração de filhotes de camundongos *Mus musculus*.** Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, vol. 56(1), p. 1-6, 2011.

RUBINSKY, B. **Principles of low temperature cell preservation**. Heart Failure Reviews. 8: 277-284, 2003.

SANTIN, T. R. *et al.* **Criopreservação de embriões – metodologias de vitrificação**. Veterinária e Zootecnia, v. 16, n.4, p. 561-574, 2009.

SEIDEL JR., G. E., SEIDEL, S.M. **Training manual for embryo transfer in cattle**. FAO ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH PAPER 77. FAO Corporate Document Repository, Capítulo 9, 1991. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/004/t0117e/T0117E09.htm#ch9>. Acessado em 14 de abril de 2016.

SHIMIZU, T. *et al.* **Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells**. Reproduction, vol. 129, n. 4, p. 463-473, 2005.

SILVA, B. M. **Efeitos do agente modificador epigenético (Tricostatina A) no desenvolvimento embrionário pré-implantacional de embriões fêmeas de bovinos**. 2011. 49 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

U.S. Department of Health & Human Services. Stem Cell information. **Appendix A: Early development**. 2001. Disponível em <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/appendixa.aspx>. Acessado em 21 de maio de 2016.

THORAT, R., INGLE, A. **An Attempt of Cryopreservation of Mouse Embryos at the ACTREC Laboratory Animal Facility in India**. Exp. Anim. 61(2), 139–145, 2012.

THOUAS, G. A. *et al.* **Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts.** Reproductive Biomedicine Online 3, 25–29, 2001.

TRASLAVINA, R. T. *et al.* **Euthanasia by CO₂ Inhalation Affects Potassium Levels in Mice.** Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 49(3): 316–322, 2010.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. **Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification.** Reproduction Biomed. Online, v.12: 779-796, 2006.

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. **Survival of mouse embryos frozen to 196°C and 269°C.** Science, 178: 411-414, 1972.

YAVIN, S.; ARAV, A. **Measurement of essential physical properties of vitrification solutions.** Theriogenology, v.67, p.81-89, 2007.

ZHANG, J. *et al.* **Vitrification of mouse embryos at 2-cell, 4-cell and 8-cell stages by cryotop method.** Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 26(11-12):621-8, 2009.