DEDALUS - Acervo - FMVZ

11300022164

ROSELI FERNANDES GONÇALVES

**CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIAIS DA TUBA UTERINA DE BOVINOS
NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE SORO FETAL BOVINO: ANÁLISE
BIOQUÍMICA, MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA.**

Tese apresentada para obtenção do
título de Doutor, junto à Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade de São Paulo

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Ferreira

São Paulo

2002

Acervo - FMVZ 021752

101746

N.º CLASSIFICAÇÃO
T. 1137
Fmvz
e:1
N.º TOMBO
021752

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

545NO1J260536

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

Gonçalves, Roseli Fernandes

Cultivo de células epiteliais da tuba uterina de bovinos na presença e ausência de soro fetal bovino: análise bioquímica, morfológica e morfométrica / Roseli Fernandes Gonçalves.

85 f. : il.

Tese (doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2002.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Ferreira.

Unitermos: 1.Órgãos genitais da fêmea animal.
2.Bovinos. 3.Morfometria. 4.Bioquímica.
5.Morfologia animal.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Domingos A. Gonçalves e Urbalina F. Gonçalves, pelo amor e exemplo. Obrigada por sempre acreditarem em mim...e pela enorme paciência.

A Anatomia, FMVZ-USP, pela grande contribuição ao aprendizado;

Ao Prof. Dr. Francisco Javier H. Blazquez pela ajuda com a morfometria;

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira pela colaboração com a estatística;

As funcionárias da Seção de Biologia Celular do Instituto Biológico de São Paulo, em especial, à Dona Maria Lúiza, pela esterilização dos materiais utilizados;

A Profa. Dra Maria Imã Seixas Duarte por ter aberto o seu laboratório no Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da USP;

A Cleuza pela grande ajuda com o material de microscopia eletrônica de Transmissão;

Ao INCOR pela utilização do microscópio eletrônico de transmissão;

Aos funcionários do Abastecedor Frigoríficos, pela amizade e paciência;

As minhas grandes amigas, Rosana, Karin, Lili e Andréa, pela valiosa amizade e incentivo;

A Kazuo e Jaqueline, por mil e um "obrigado" e a minha cunhada, Marilú A. R. F.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta obra, especialmente, a Eduardo F. Gonçalves, pela enorme paciência e

A FAPESP pelo apoio financeiro, carinho.

AGRADECIMENTOS

- . Ao Prof. Dr. Nilson Ferreira, pela orientação, incentivo, confiança e amizade;
- . À Magali D'Angelo, pela valiosa colaboração, orientação e amizade. Obrigada por ter tido a oportunidade de continuar trabalhando com você;
- . Aos docentes da Anatomia, FMVZ-USP, pela grande contribuição ao aprendizado;
- . Ao Prof. Dr. Francisco Javier H. Blazquez pela ajuda com a morfometria;
- . Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira pela colaboração com a estatística;
- . Às funcionárias da Seção de Biologia Celular do Instituto Biológico de São Paulo, em especial, à Dona Maria Luiza, pela esterilização dos materiais utilizados;
- . À Profa. Dra Maria Irmã Seixas Duarte por ter aberto o seu laboratório no Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da USP;
- . À Cleuza pela grande ajuda com o material de microscopia eletrônica de Transmissão;
- . Ao INCOR pela utilização do microscópio eletrônico de transmissão ;
- . Aos funcionários do Abatedouro Frigosef, pela amizade e paciência;
- . Às minhas grandes amigas, Rosana, Karin, Lílian e Andréa, pela valiosa amizade e incentivo;
- . À Kazue e Jaqueline, por mil e um "quebra-galhos";
- . A todos que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho;
- . À FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

GONÇALVES, R. F. Cultivo de células epiteliais da tuba uterina de bovinos na presença e ausência de soro fetal bovino: análise bioquímica, morfológica e morfométrica. [Culture of bovine uterine tube epithelial cells with and without bovine calf serum: biochemistry analysis, morphology, and morphometry]. São Paulo, 2002. 85 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Foi realizado um estudo bioquímico, morfológico e morfométrico de células epiteliais da tuba uterina de bovinos na presença e ausência de soro fetal bovino *in vitro*. Para determinar os efeitos do soro fetal bovino sobre as células foram utilizados como parâmetros sua influência sobre o crescimento, a morfologia qualitativa e quantitativa, o consumo de glicose, a síntese protéica, a atividade da fosfatase láctica e da desidrogenase láctica, em diferentes dias de cultivo. Nas eletromicrografias foram analisados os seguintes componentes celulares: núcleo, grânulos de secreção, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi e outras estruturas citoplasmáticas. A cinética de crescimento foi maior na presença de soro. A microscopia eletrônica de transmissão evidenciou inicialmente dois tipos de células, as ciladas e as secretoras que foram gradativamente diferenciando-se durante todo o tempo de cultivo, na presença e na ausência de soro fetal bovino. Na presença de soro observou-se uma monocamada confluenta no dia cinco, enquanto na ausência do mesmo não se notou monocamada confluenta até o final do experimento. Um terceiro tipo celular foi observado, tratava-se de uma célula da monocamada com microvilosidades. A análise morfométrica revelou que os três tipos celulares apresentaram diferenças significativas em alguns dos parâmetros avaliados. A análise bioquímica evidenciou algumas diferenças significativas no meio de cultivo. Pode-se concluir que o soro fetal bovino não interfere nas principais características morfológicas, mas sim na formação da monocamada e de certos parâmetros morfométricos e bioquímicos, talvez por apresentar componentes desconhecidos, tais como, proteínas, ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e/ou vitaminas, sendo que a presença e concentração destes pode variar muito entre diferentes lotes, alterando o meio de cultivo. Estudos com outros suplementos ou mesmo fatores de aderência devem ser realizados visando um modelo *in vitro* que auxilie na compreensão das interações das células da tuba uterina com os gametas e embriões.

Unitermos: Órgão genitais da fêmea animal, Bovinos, Morfometria, Bioquímica, Morfologia animal.

RESUMO

GONÇALVES, R. F. **Cultivo de células epiteliais da tuba uterina de bovinos na presença e ausência de soro fetal bovino: análise bioquímica, morfológica e morfométrica**. [Culture of bovine uterine tuba epithelial cells with and without bovine calf serum: biochemistry analysis, morphology, and morphometry]. São Paulo, 2002. 85 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Foi realizado um estudo bioquímico, morfológico e morfométrico de células epiteliais da tuba uterina de bovinos na presença e ausência de soro fetal bovino *in vitro*. Para determinar os efeitos dos soro fetal bovino sobre as células foram utilizados como parâmetros sua influência sobre o crescimento, a morfologia qualitativa e quantitativa, o consumo de glicose, a síntese protéica, a atividade da fosfatase láctica e da deidrogenase láctica, em diferentes dias de cultivo. Nas eletromicrografias foram analisados os seguintes componentes celulares: núcleo, grânulos de secreção, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi e outras estruturas citoplasmáticas. A cinética de crescimento foi maior na presença de soro. A microscopia eletrônica de transmissão evidenciou inicialmente dois tipos de células, as ciliadas e as secretoras que foram gradativamente diferenciando-se durante todo o tempo de cultivo, na presença e na ausência de soro fetal bovino. Na presença de soro observou-se uma monocamada confluenta no dia cinco, enquanto na ausência do mesmo não se notou monocamada confluenta até o final do experimento. Um terceiro tipo celular foi observado, tratava-se de uma célula da monocamada com microvilosidades. A análise morfométrica revelou que os três tipos celulares apresentaram diferenças significativas em alguns dos parâmetros avaliados. A análise bioquímica evidenciou algumas diferenças significativas no meio de cultivo. Pode-se concluir que o soro fetal bovino não interfere nas principais características morfológicas, mas sim na formação da monocamada e de certos parâmetros morfométricos e bioquímicos, talvez por apresentar componentes desconhecidos, tais como, proteínas, ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e/ou vitaminas, sendo que a presença e concentração destes pode variar muito entre diferentes lotes, alterando o meio de cultivo. Estudos com outros suplementos ou mesmo fatores de aderência devem ser realizados visando um modelo *in vitro* que auxilie na compreensão das interações das células da tuba uterina com os gametas e embriões.

Unitermos: Órgão genitais da fêmea animal, Bovinos, Morfometria, Bioquímica, Morfologia animal.

GONÇALVES, R. F. **Culture of bovine uterine tuba epithelial cells with and without bovine calf serum: biochemistry analysis, morphology, and morphometry.** [Cultivo de células epiteliais da tuba uterina de bovinos na presença e ausência de soro fetal bovino: análise bioquímica, morfologia e morfometria]. São Paulo, 2002. 85 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The biochemistry, morphology and morphometry study were performed in bovine tuba uterina epithelial cells *in vitro* with and without bovine calf serum. It has been observed the effects of bovine calf serum in the cells by growth, qualitative and quantitative morphology, glucose and protein source, acid phosphatase and lactic dehydrogenase in different days. It has been analysed some cell structures, like: nuclei, Golgi regions, rough endoplasmatic reticulum, mitochondria, secretory vesicles and others by the electron microscopy. The cell growth was higher with serum. The electron microscopy has showed two cells: the secretory and ciliated, both were differentiating during the experiment. The monolayers with serum was confluent in the day 5, but it has not happened the same without serum. The structural analysis of monolayer showed a cell with microvilli. The morphometry and biochemistry have showed significant differences in both cells and in the medium. Maybe it has been happened because the serum is an effective growth-promoting supplement. Therefore, more studies are needed with others supplements or attachment factors to have *in vitro* model that mimic *in vivo* conditions most closely to study the interactions between bovine tuba uterina epithelial cells and gametes or embryos.

Uniterms: Animal female genital organ, Bovine, Morphometry, Biochemistry, Morphology.

11	INTRODUÇÃO.....	01
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1	Anatomia Funcional e Fisiológica da Tuba Uterina.....	05
2.2	Sistemas de co-cultivo.....	06
2.3	Efeitos do soro fetal bovino.....	08
2.4	Características das Células Epiteliais da Tuba Uterina Bovina <i>in vitro</i>	10
3	MATERIAL E MÉTODO.....	16
3.1	Células; cultura primária da tuba uterina de bovinos.....	17
3.2	Efeitos do soro fetal bovino sobre a cinética de crescimento celular.....	18
3.3	Análise Bioquímica.....	18
3.3.1	Consumo de glicose.....	19
3.3.2	Atividade proteica.....	20
3.3.3	Atividade da fosfatase ácida.....	21
3.3.4	Atividade da desidrogenase láctica (DHAP).....	23
3.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	24
3.4	Morfometria.....	24
3.4.1	Obtenção do material.....	24
3.4.2	Fixação das células.....	25
3.4.3	Pós-fixação das células.....	25
3.4.4	Desidratação.....	25
3.4.5	Infiltração.....	26
3.4.6	Tinagem.....	26

11	INTRODUÇÃO.....	01
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1	Anatomia Funcional e Fisiológica da Tuba Uterina.....	05
2.2	Sistemas de co-cultivo.....	06
2.3	Efeitos do soro fetal bovino.....	08
2.4	Características das Células Epiteliais da Tuba Uterina Bovina <i>in vitro</i>	10
3	MATERIAL E MÉTODO.....	16
3.1	Células: cultura primária da tuba uterina de bovinos.....	17
3.2	Efeitos do soro fetal bovino sobre a cinética de crescimento celular.....	18
3.3	Análise Bioquímica.....	18
3.3.1	Consumo de glicose.....	19
3.3.2	Atividade protéica.....	20
3.3.3	Atividade da fosfatase ácida.....	21
3.3.4	Atividade da deidrogenase láctica (DHL).....	23
3.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	24
3.4	Morfometria.....	21
3.4.1	Obtenção do material.....	24
3.4.2	Fixação das células.....	25
3.4.3	Pós-fixação das células.....	25
3.4.4	Desidratação.....	25
3.4.5	Infiltração.....	26
3.4.6	Trimagem.....	26

3.4.7	Cortes semifinos e ultrafinos.....	26
3.4.8	Análises e documentação.....	27
3.5	Morfometria.....	27
3.5.1	Avaliação da densidade de volume - estimativa do número total de pontos necessários para avaliação da densidade de volume pelo método de contagem de pontos, para se obter um nível de erro pré-determinado (erro padrão relativo).....	27
3.5.2	Procedimentos para estudos morfométricos de componentes celulares das células epiteliais da tuba uterina ao microscópio eletrônico.....	29
3.5.3	Avaliação da densidade de volume dos componentes celulares da célula secretora, ciliada e da monocamada.....	30
3.6	Análise Estatística.....	31
4	RESULTADOS.....	32
4.1	Cultivo da Tuba Uterina.....	33
4.2	Efeitos do Soro Fetal Bovino Sobre a Cinética de Crescimento Celular.....	36
4.3	Análise Bioquímica.....	37
4.3.1	Consumo de glicose.....	37
4.3.2	Atividade protéica.....	38
4.3.3	Atividade da fosfatase ácida.....	39
4.3.4	Atividade da deidrogenase láctica (DHL).....	41
4.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	42
4.5	Morfometria.....	51

SUMÁRIO

4.5.1	Célula secretora.....	51
4.5.2	Célula ciliada.....	56
4.5.3	Célula da monocamada.....	61
5	DISCUSSÃO.....	67
6	CONCLUSÕES.....	75
7	REFERÊNCIAS.....	77

INTRODUÇÃO:

A tuba uterina (INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE, 1994) é um importante órgão na reprodução dos mamíferos, onde ocorrem diversos eventos, tais como: transporte dos gametas, capacitação espermática, fecundação e desenvolvimento dos primeiros estágios do embrião. As interações entre as células epiteliais da tuba uterina e gametas ou embriões não têm sido muito bem estudadas, tornando-se importante a utilização de um modelo *in vitro* que mimetize as condições *in vivo*.

A adição de soro fetal bovino ao meio pode aumentar a eficiência do cultivo. Por exemplo, no co-cultivo com embriões *in vitro*, mas também pode introduzir componente tóxico ou patogênico, como por exemplo vírus. Além de o soro conter componentes desconhecidos, tais como enzimas, açúcares, graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e/vit. Vitâminas, a presença e concentração destas pode variar muito entre diferentes lotes, afetando o meio de cultivo e o desenvolvimento embrionário (KRAEMER et al., 1993; GARDNER, 1998; GOMEZ e DIEZ, 2000; NIEMANN e WRISLEY, 1999; THOMPSON, J. G., 2000). Desse modo, a presença do soro no meio de cultivo pode dificultar a identificação dos fatores essenciais para o desenvolvimento dos embriões, além da possibilidade de gerar alterações na morfologia e metabolismo do embrião, problemas no desenvolvimento, que culminam em fetos com tamanho exagerado (DOLIVALS et al., 1997; JACOBSEN et al., 2000; THOMPSON, J. G.,

INTRODUÇÃO:

O principal objetivo desse trabalho foi o de avaliar as possíveis alterações. A tuba uterina (INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE, 1994) é um importante órgão na reprodução dos mamíferos, onde ocorrem diversos eventos, tais como: transporte dos gametas, capacitação espermática, fecundação e desenvolvimento dos primeiros estágios do embrião. As interações entre as células epiteliais da tuba uterina e gametas ou embriões não têm sido muito bem estudadas, tornando-se importante a utilização de um modelo *in vitro* que mimetize as condições *in vivo*.

A adição de soro fetal bovino ao meio pode aumentar a eficiência do cultivo. Por exemplo, no co-cultivo com embriões *in vitro*, mas também pode introduzir componente tóxico ou patógenos, como por exemplo, vírus. Além de o soro conter componentes desconhecidos, tais como, proteínas, ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e/ou vitaminas, a presença e concentração destes pode variar muito entre diferentes lotes, alterando o meio de cultivo e o desenvolvimento embrionário (KRISHER et al., 1999; GARDNER, 1999; GOMEZ e DIEZ, 2000; NIEMANN e WRENZYCKI, 2000; THOMPSON, J. G., 2000). Desse modo, a presença do soro no meio de cultivo pode dificultar a identificação dos fatores secretados pelas células epiteliais da tuba uterina, além da possibilidade de gerar alterações na morfologia e metabolismo do embrião, problemas no desenvolvimento pós-implantação e fetos com tamanho exagerado (EDWARDS et al., 1997; JACOBSEN et al., 2000; THOMPSON, J. G., 2000).

O principal objetivo desse trabalho foi o de avaliar as possíveis alterações morfológicas, morfométricas e bioquímicas no cultivo de células epiteliais da tuba uterina bovina em meio TCM - 199 (*Tissue Culture Medium* - 199) na presença e ausência de soro fetal bovino.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia Funcional e Fisiológica da Tuba Uterina

A primeira descrição anatômica da tuba uterina de mamíferos foi publicada por FALLOPIUS (1961) *apud* BECK e BOOTS (1974). HAFEZ e BLANDAU (1969) fizeram a primeira revisão da tuba uterina e suas funções. É um tubo contorcido que se estende do útero até a superfície do ovário e está suspenso, dentro da cavidade abdominal, na mesosalpinge. A tuba uterina bovina varia de 21 a 30cm de comprimento e pode ser dividida em 3 regiões, baseada no diâmetro e estrutura interna (WEETH e HERMAN, 1952). O infundíbulo, com grande número de células ciliadas, juntamente com as fimbrias, é em forma de funil e se abre para a tuba uterina, localizado adjacente ao ovário. A ampola, região secretora verdadeira, é o segmento intermediário. O istmo, região predominantemente muscular, une a ampola ao corpo uterino (BEARDEN e FUQUAY, 1997; MENEZO e GUERIN, 1997).

A tuba uterina apresenta duas camadas musculares, uma circular interna e outra longitudinal externa. O lúmen é cercado por uma camada serosa composta por células epiteliais e tecido conjuntivo. Do infundíbulo em direção à junção útero-tubária há uma redução do diâmetro do lúmen e uma complexa camada mucosa, enquanto há um aumento na proporção de músculo liso (LOMBARD *et al.*, 1950; EL-BANNA e HAFEZ, 1970).

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia Funcional e Fisiológica da Tuba Uterina

A primeira descrição anatômica da tuba uterina de mamíferos foi publicada por FALLOPIUS (1611) *apud* BECK e BOOTS (1974). HAFEZ e BLANDAU (1969) fizeram a primeira revisão da tuba uterina e suas funções. É um tubo contorcido que se estende do útero até a superfície do ovário e está suspenso, dentro da cavidade abdominal, na mesosalpinge. A tuba uterina bovina varia de 21 a 30cm de comprimento e pode ser dividida em 3 regiões, baseada no diâmetro e estrutura interna (WEETH e HERMAN, 1952). O infundíbulo, com grande número de células ciliadas, juntamente com as fímbrias, é em forma de funil e se abre para a tuba uterina, localizado adjacente ao ovário. A ampola, região secretora verdadeira, é o segmento intermediário. O istmo, região predominantemente muscular, une a ampola ao corno uterino (BEARDEN e FUQUAY, 1997; MENEZO e GUERIN, 1997).

A tuba uterina apresenta duas camadas musculares, uma circular interna e outra longitudinal externa. O lúmen é cercado por uma camada serosa composta por células epiteliais e tecido conjuntivo. Do infundíbulo em direção à junção útero-tubárica há uma redução do diâmetro do lúmen e uma complexa camada mucosa, enquanto há um aumento na proporção de músculo liso (LOMBARD *et al.*, 1950; EL-BANNA e HAFEZ, 1970).

Quanto à vascularização, as artérias são derivadas da artéria ovariana e as veias são satélites das artérias. Os vasos linfáticos passam com os vasos ovarianos para os nodos lombares. Os nervos são derivados do sistema simpático através dos plexos renal e aórtico abdominal, assim como no ovário (SISSON, 1986).

O epitélio da tuba uterina bovina contém, predominantemente, dois tipos de células: as ciliadas e as secretoras não ciliadas, ambas influenciadas por hormônios ovarianos (ABE e OIKAWA, 1993; JOSHI, 1995; VAN LANGENDONCKT et al., 1995; MENEZO e GUERIN, 1997; ELMESTRAH e KAN, 1999). As células secretoras apresentam ciclos de hipertrofia e atrofia durante todo o ciclo estral (YÁNIZ et al., 2000). Os cílios, normalmente, não estão presentes na vida fetal e aparecem no momento do parto ou antes da puberdade (MENEZO e GUERIN, 1997). De acordo com HUNTER et al. (1991), as células ciliadas estão envolvidas no transporte do oócito e, possivelmente, na regulação da progressão espermática, enquanto que as células não ciliadas secretam fatores protéicos. O papel desses fatores ainda é desconhecido, mas vários autores os associam com a maturação dos gametas, fecundação e desenvolvimento embrionário pré-implantação (NANCARROW e HILL, 1995; THOMPSON et al., 1998; BUHL et al., 2000).

2.2 Sistemas de co-cultivo

Na maioria dos mamíferos o embrião é submetido a um

bloqueio no desenvolvimento *in vitro*, mais freqüentemente, ao tempo da ativação genômica (MENEZO et al., 1990; CATT, 1994; NANCARROW e HILL, 1994). Condições de cultivo não adequadas levam a um bloqueio no desenvolvimento ou à perda de viabilidade embrionária (EDIRISINGHE et al., 1984; THOMPSON, 1997; GARDNER, 1998; BAVISTER, 2000; KHURANA e NIEMANN, 2000). *In vivo*, é possível que o ambiente da tuba uterina compense algumas deficiências da expressão genômica no embrião. A tuba uterina deve secretar componentes não específicos, como por exemplo, lipídeos e fatores de crescimento, necessários ao desenvolvimento. Além disso, durante a migração na tuba uterina, o embrião parece induzir a liberação de substâncias específicas (VILLALON et al., 1982; LEIBFRIED-RUTLEDGE, 1999).

Até a alguns anos atrás, o sucesso do cultivo de embriões fecundados *in vitro* limitava-se ao uso de receptoras intermediárias (THOMPSON, 2000), ou seja, ao cultivo *in vivo* em ovelhas (LU et al., 1987; LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1989) e em coelhas (FUKUI et al., 1989; OLIVEIRA FILHO et al., 1991). No intuito de superar o bloqueio no desenvolvimento e problemas de viabilidade, vários sistemas de co-cultivo foram estabelecidos.

O co-cultivo com fibroblastos uterinos (KUSAN e WRIGHT, 1982; VOELKEL et al., 1985), vesículas trofoblásticas (CAMOUS et al., 1984; HEYMAN et al., 1987; POOL et al., 1988; AOYAGI et al., 1989), monocamadas de células epiteliais da tuba uterina (GANDOLFI e MOOR, 1987; EYESTONE et al., 1987; WHITE et al., 1989; EYESTONE e FIRST,

1989; WATANABE, 1993; OLIVEIRA FILHO et al., 1994), monocamada de células do cumulus ooforus (KAJIHARA et al., 1987; GOTO et al., 1988; GOTO et al., 1992), monocamada de células da granulosa (GOTO et al., 1988; REXROAD, 1989), células de rim bovino (MDBK), de camundongo (STO) e de macaco (Vero), (OUIHIBI et al., 1990; SCODRAS et al., 1991; MENEZO et al., 1990; FRYDMAN et al., 1993; MENCK et al., 1997) e meio condicionado com células da tuba uterina (MECHEKOUR et al., 1990; ECTORS et al., 1993) apresentaram sucessos variados no desenvolvimento de embriões ovinos, suínos e bovinos *in vitro* (VAN WAGTENDONK-DELEEUW et al., 2000). Estes estudos sugerem que as células somáticas alteram o meio de cultivo, melhorando o ambiente para o desenvolvimento embrionário.

2.3 Efeitos do soro fetal bovino

Os primeiros experimentos com culturas de tecidos foram realizados com fluídos orgânicos de animais, por exemplo, a linfa. Quando Eagle (1955), elaborou um meio de cultura básico contendo aminoácidos, carboidratos, vitaminas e minerais, notou-se que a suplementação do meio com fluídos orgânicos ainda era necessária, uma vez que apresentava fatores indefinidos, mas essenciais para o crescimento celular. A suplementação do meio de cultura básico com 20% de soro animal foi amplamente utilizada. Devido à presença de fatores de crescimento e pequena quantidade de gama-globulina, o SFB tem sido um dos mais

utilizados. A concentração de seu uso é de 10%, embora possa ser modificado dependendo do cultivo.

Dentre as vantagens na utilização do SFB, temos: a presença da maioria dos fatores necessários para a proliferação e manutenção das células; a sua eficácia na maioria em diferentes tipos de cultivos celulares; ação de tampão, inibindo efeitos adversos, como a mudança de pH, a presença de metais pesados, atividade proteolítica ou mesmo endotoxinas (DAVIS, 1994).

A adição de SFB ao meio também pode apresentar algumas desvantagens que causam diferentes alterações, tais como: deficiências na reprodutibilidade, risco de contaminação por bactéria, fungo, micoplasma e vírus; disponibilidade; custo; dificuldades na purificação de proteínas secretadas pelas células; origem e qualidade (KRISHER et al., 1999; GARDNER, 1999; GOMEZ e DIEZ, 2000; NIEMANN e WRENZYCKI, 2000; THOMPSON, J. G., 2000).

Desse modo, a presença do soro no meio de cultivo pode dificultar a identificação dos fatores secretados pelas células epiteliais da tuba uterina, além da possibilidade de gerar alterações na morfologia e metabolismo do embrião, problemas no desenvolvimento pós-implantação e fetos com tamanho exagerado (EDWARDS et al., 1997; JACOBSEN et al., 2000; THOMPSON, J. G., 2000).

VAN LANGENDONCKT et al. (1995) analisaram a atividade protéica e metabólica de células da tuba uterina inicialmente cultivadas com SFB e, após confluência, cultivadas sem o soro. Essas por sua vez não

apresentaram diferenças significativas quando comparadas com células cultivadas na presença de soro.

EDWARDS et al. (1997) observaram que o cultivo de células epiteliais da tuba uterina na presença de SFB alterava a composição de carboidratos do meio TCM-199. A concentração de glicose diminuía após 48 horas, ao contrário das concentrações de piruvato e L-lactato. NIEMANN e WRENZYCKI (2000) observaram que embriões cultivados sem soro apresentavam alterações na expressão de alguns RNAm, que poderiam estar associados com a manutenção da compactação em blastocistos e por fetos com tamanho exagerado.

HISHINUMA et al. (1989) notou que algumas massas de células

2.4 Características das Células Epiteliais da Tuba Uterina Bovina *in vitro*

As células ciliadas livres aderem após dois dias de cultivo. A confluência

é completa no quarto dia. Não houve diferença no crescimento celular quando As células da tuba uterina bovina, quando cultivadas, aderem-se na placa de cultura em dezoito a vinte horas e mantêm a motilidade ciliar por três a quatro dias. Alguns grupos de células não se aderem e ficam flutuando sob forma de vesículas, tendo movimento ciliar ativo por nove a dez dias. A confluência total ocorre entre dez a doze dias. Na microscopia eletrônica de transmissão, as células mantiveram a sua polaridade com presença de microvilos em sua superfície livre, além de desmossomas. As células ciliadas, com quatro dias de cultivo, apresentavam poucos cílios intactos e presença de microvilos, além de pouco retículo endoplasmático rugoso, mas muitas mitocôndrias, ribossomos livres, poliribossomos e

microtúbulos. Em algumas dessas células notavam-se cílios intactos, enquanto em outras os cílios pareciam ser substituídos por microvilos e o seu citoplasma continha vacúolos com componentes dos cílios. Entre o sexto e oitavo dia de cultivo, essas células apresentavam um grande número de corpos basais dentro do citoplasma em associação com um grande número de vesículas e microtúbulos. Já as secretoras, com seis a oito dias de cultivo apresentaram complexos de Golgi bem desenvolvidos com abundantes retículos endoplasmáticos rugosos e poliribossomos distribuídos em seu citoplasma. Cortes longitudinais dessas células mostraram a presença de vesículas próximas aos complexos de Golgi (JOSHI, 1988).

HISHINUMA et al. (1989) notou que algumas massas de células aderem na placa de cultura dentro de doze a vinte e quatro horas, enquanto que as células ciliadas livres aderem após dois dias de cultivo. A confluência é completa no quarto dia. Não houve diferença no crescimento celular quando comparada à fase do ciclo estral (luteal e folicular), assim como a região da tuba uterina (ampola e istmo). Os mesmos resultados foram obtidos quanto à microscopia eletrônica de transmissão, mas notou-se que além de desmossomas havia muitos complexos juncionais e interdigitações entre as membranas celulares, além de grânulos de secreção de diferentes tamanhos e densidades.

THIBODEAUX et al. (1992) classificaram, pela coloração de Giemsa, a qualidade das células epiteliais da tuba uterina bovina *in vitro*. As células que apresentavam grande incorporação do corante eram as de boa qualidade, enquanto que as com baixa incorporação do corante, além de alto

grau de vacuolização, eram consideradas de qualidade inferior. A formação de vacúolos coincidia com a degeneração celular e não estava ligada ao tipo de isolamento celular.

VAN LANGENDONCKT et al. (1995) notaram que os dois tipos de células existentes, ciliadas e secretoras, diferenciavam-se gradativamente durante o cultivo. Essas células formavam uma monocamada confluenta após seis dias de cultivo em TCM 199 (Tissue Culture Medium 199), suplementado com 10% de SFB. O desenvolvimento celular foi similar aos já descritos. Através das microscopias eletrônica de transmissão e de contraste de fase observaram que não houve contaminação por outros tipos celulares. Observou-se também a presença de glicocálix e desmossomos, além de numerosas mitocôndrias, um retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi bem desenvolvidos, cromatina descondensada e vários nucléolos o que indicam a intensa atividade de síntese dessas células. A análise imunocitoquímica, utilizando anticorpos para citoqueratina 8-18, confirmou os resultados das microscopias, provando que o isolamento mecânico pode ser utilizado ao invés do isolamento enzimático.

Ao compararem o cultivo com um meio na ausência de SFB após cultivo por sete dias na presença de soro, VAN LANGENDONCKT et al. (1995) observaram, pela microscopia de contraste de fase, que a maioria das células manteve suas características após um mês de cultivo. Entretanto, alguns sinais indicaram que a atividade celular eçou a decair, isto é, menos polissomos e retículo endoplasmático rugoso, acúmulo de filamentos intermediários na célula, cromatina mais compacta, ausência de

glicocálix e pequeno número de mitocôndrias. Essas observações sugeriram que o cultivo na ausência de SFB não pode ser estendido por mais de uma semana.

JOSHI (1995) isolou as mesmas células com collagenase e observou que elas proliferavam rapidamente, atingindo a confluência total entre o quinto e sexto dia. As células ciliadas que aderiram à placa de cultivo perderam todos os seus cílios após cinco dias de cultivo, sendo que alguns grupos de células que permaneceram no meio mantiveram os cílios até o oitavo e décimo dia. Quando submetidas à microscopia eletrônica de transmissão, apresentavam as mesmas características anteriormente observadas. As células da monocamada começaram a apresentar vacúolos citoplasmáticos a partir do décimo e décimo quinto dia, apesar poderem ser repicadas por até três vezes consecutivas sem grandes mudanças morfológicas.

WALTER (1995) comparou três métodos de isolamento das células epiteliais da tuba uterina bovina: mecânico, collagenase e tripsinização. O mais adequado foi o mecânico, pois era fácil, barato, não tinha contaminação por outros tipos celulares e não acarretava danos celulares como os enzimáticos. Testando diferenças de temperatura no cultivo celular (37°C e 39°C), notou que não existiu diferença significativa. As células que não aderiram ao frasco mantiveram seus cílios e atividade secretora até doze dias de cultivo. As células que aderiram modificavam-se diferentemente daquelas que não estavam presentes na monocamada. Não foram observados cílios, corpos basais ou mesmo grânulos de secreção nas

células da monocamada a partir do sétimo dia de cultivo. Microfilamentos citoplasmáticos foram encontrados próximos à região apical e basal das células epiteliais.

GÓMEZ e URÍA (1997) cultivaram células da tuba uterina em condições de polarização e não polarização. Observaram que as células cultivadas em condições de polarização apresentaram características ultraestruturais mais próximas às mesmas células *in vivo* e sinais de atividade metabólica maior que as células cultivadas em outras condições.

REISCHL et al. (1999) compararam diferentes materiais de suporte celular, assim como dois sistemas de cultivo (cultivo estático e de perfusão) através de microscopia eletrônica de transmissão. As diferenças morfológicas foram insignificantes nos primeiros dias de cultivo e tornaram-se mais evidentes após oito dias. No sistema estático, as células perderam algumas de suas principais características, tais como, cílios e protrusões secretoras, enquanto no cultivo de perfusão, mantiveram-se presentes. Também foram observadas, no sistema de perfusão, intensa ciliogênese e organelas citoplasmáticas comuns em células secretoras.

GONÇALVES et al. (1999) observaram através da microscopia de luz que o cultivo de células da tuba uterina apresentava um aumento da vacuolização do citoplasma das células, relacionado ao tempo de cultivo e a degeneração celular, enquanto que as células viáveis e de boa qualidade apresentaram-se mais coradas tanto pela violeta de genciana quanto pela toluidina-fucsina. A microscopia eletrônica de varredura evidenciou dois tipos de células, as ciliadas e as secretoras não ciliadas, sendo que as primeiras

desapareceram, após o décimo quarto dia de cultivo, restando apenas células com microvilosidades ao invés de cílios.

MATERIAL E MÉTODO

3.1 Células: cultura primária da tuba uterina de bovinos

As células para cultura primária da tuba uterina bovina foram obtidas de vacas e novilhas provenientes do abatedouro Mantiqueira, São José dos Campos, São Paulo.

Aproximadamente entre quinze e vinte minutos após a morte do animal, no momento da evisceração, as tubas uterinas foram coletadas de ovários que apresentaram sinais de ovulação recente, como a presença de folículo rompido ou corpo lúteo, vacas que estavam, provavelmente, no metestro. Esse material foi transportado em frasco contendo solução salina tamponada (PBS) esterilizada, pH 7,2 e acrescida de antibiótico (0,1% de Gentamicina®) à temperatura de 4°C. O frasco, contendo as tubas uterinas, foi mantido em caixa de isopor com gelo durante o transporte abatedouro/laboratório.

No laboratório de Biologia Celular do Instituto Biológico do Estado de São Paulo, as tubas uterinas foram lavadas duas vezes em PBS. No interior de capela de fluxo laminar, elas foram dissecadas com auxílio de uma pinça e tesoura fina estéreis. Após a dissecação, as tubas uterinas foram transportadas para uma placa de Petri com gaze levemente embebida em álcool 70%. Rapidamente, retiramos uma pequena porção das suas extremidades, colocando a tuba uterina em uma placa de Petri com PBS. Em seguida, com uma lâmina fixamos uma extremidade da tuba uterina e, com outra, comprimimos, exteriorizando seu conteúdo, em sentido fimbriastral. As células obtidas mais os 2ml de PBS são aspirados

MATERIAL E MÉTODO

3.1 Células: cultura primária da tuba uterina de bovinos

As células para cultura primária da tuba uterina bovina foram obtidas de vacas e novilhas provenientes do abatedouro Mantiqueira, São José dos Campos, São Paulo.

Aproximadamente entre quinze e vinte minutos após a morte do animal, no momento da evisceração, as tubas uterinas foram coletadas de ovários que apresentaram sinais de ovulação recente, como a presença de folículo rompido ou corpo lúteo, vacas que estavam, provavelmente, no metaestro. Esse material foi transportado em frasco contendo solução salina tamponada (PBS) esterilizada, pH 7,2 e acrescida de antibiótico (0,1% de Gentamicina®) à temperatura de 4°C. O frasco, contendo as tubas uterinas, foi mantido em caixa de isopor com gelo durante o transporte abatedouro/laboratório.

No laboratório de Biologia Celular do Instituto Biológico do Estado de São Paulo, as tubas uterinas foram lavadas duas vezes em PBS. No interior da capela de fluxo laminar, elas foram dissecadas com auxílio de uma pinça e tesoura fina estéreis. Após a dissecação, as tubas uterinas foram transportadas para uma placa de Petri com gaze levemente embebida em álcool 70%. Rapidamente, retiramos uma pequena porção das suas extremidades, colocando a tuba uterina em outra placa de Petri com 2ml de PBS. Em seguida, com uma lâmina fixamos uma extremidade da tuba uterina e, com outra, comprimimos, exteriorizando seu conteúdo, em sentido fimbria/istmo. As células obtidas mais os 2ml de PBS são aspirados

(micropipeta de 1000 μ l) e colocados em tubo de centrífuga contendo 3ml de PBS. Deixamos decantar, retiramos o sobrenadante e lavamos mais duas vezes (EYESTONE e FIRST, 1989). O cultivo foi realizado em garrafas de cultivo de 25cm³ (CORNING), onde colocamos 7ml de TCM 199 (Tissue Culture Medium – 199, Gibco®) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Sigma®), 0,1% de antibiótico (Gentamicina), 34mg de piruvato(Sigma®)/100ml de meio com 100 μ l do *pellet* (sedimento) em cada uma. Também foram preparadas garrafas sem soro fetal bovino. Ambas são cultivadas a 37°C em 5% de CO₂ em ar.

A troca parcial de 2,5ml de meio das células foi realizada no segundo, quarto e sexto dias.

3.2 Efeitos do soro fetal bovino sobre a cinética de crescimento celular

As células foram semeadas na densidade de 2x10⁵ células/frasco. Depois de 24, 48 e 72 horas, séries de dois frascos para cada tratamento foram tripsinizados e a determinação do número de células feita em câmara tipo Neubauer (Resistence, Germ.®).

3.3 Análise Bioquímica

Nos dias zero, um, quatro, sete e dez retiramos uma alíquota de 1ml do meio, com e sem soro fetal bovino e congelamos à -20°C.

Posteriormente, avaliamos alguns parâmetros bioquímicos (análise de possíveis alterações fisiológicas), tais como: consumo de glicose e atividades protéica, da fosfatase ácida e da deidrogenase láctica. Para a análise bioquímica foram utilizados *Kits Doles*®.

3.3.1 Consumo de glicose

Foi misturado por agitação e incubado por 10 minutos em banho-maria. Foi utilizado o kit Glucos 500 (Doles®). Esse é um método enzimático colorimétrico, onde se usa uma enzima específica para glicose: Glicose Oxidase (DOLES, 1972).

Transferiu-se todo o conteúdo de um frasco de tampão/enzimas para um balão volumétrico de 250ml com água destilada. Agitado levemente por inversão até a completa dissolução. O reagente de uso, após preparo, apresentou a seguinte formulação: tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, 4-Aminoantipirina 1,25mmol, p-Hidroxibenzoato 10mmol com um mínimo de 12.000U.I. de Glicose Oxidase e 1.200U.I. de Peroxidase por litro. Essa solução permanece estável por seis meses sob refrigeração (2-6°C).

Foram rotulados três tubos de ensaio com B(branco), T(teste) e P(padão) e procedido como mostra a Tab. 1.

Tabela1- Preparo dos reagentes para o Glucos500.

	B	T	P
Reagente de cor	2,0ml	2,0ml	2,0ml
Solução padrão	—	—	20 μ l
Amostra	—	20 μ l	—

Foi misturado por agitação e incubado por 10 minutos em banho-maria, a 37°C. Após a retirada do banho-maria foi feita a leitura em espectrofotômetro (Hitachi U2001), em 510nm, zerando o aparelho com o branco e calibrando com o padrão de 100mg/dl (solução aquosa contendo 100mg/dl de glicose).

3.3.2 Atividade protéica

Foi utilizado o kit Proteínas Totais (Doles®), o qual utiliza a metodologia do biureto modificado (HENRY et al., 1957). O reagente do biureto modificado, uma solução de Sulfato de Cobre, Citrato trissódico, Carbonato de Sódio e Hidróxido de Sódio, reage com as proteínas da amostra, formando um complexo corado de cor violeta, que é proporcional à concentração protéica da amostra.

Adicionou-se a solução de um frasco de biureto (solução concentrada) a um balão volumétrico de 500ml e acertou-se o volume até a marca. Homogeneizou-se bem e transferiu-se para um vasilhame plástico. A solução de biureto apresentou a seguinte composição: Citrato Trissódico

0,114M, Carbonato de Sódio 0,21M e Sulfato de Cobre 0,01M. Essa solução permanece estável por dois anos, à temperatura de 20-30°C.

Foram rotulados três tubos de ensaio com B(branco), T(teste) e P(padrão) e procedido como mostra a Tab. 2.

Tabela2- Preparo dos reagentes para a Proteína.

	B	T	P
Reagente de cor	5,0ml	2,5ml	2,5ml
Amostra	—	0,5ml	—
NaOH 6M	3 gotas	3 gotas	3 gotas

Foi homogeneizado e deixado em repouso por 5 minutos, à temperatura ambiente (20-30°C). Realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Hitachi U2001), em 510nm, zerando o aparelho com o branco e calibrando com o padrão de proteínas totais 4g/dL (solução de albumina bovina estabilizada com azida sódica 1:1000).

3.3.3 Atividade da fosfatase ácida

Foi utilizado o kit fosfatases (Doles®). Trata-se do método de Bessey-Lowry modificado (BESSEY et al., 1946) que utiliza o p-Nitrofenilfosfato na quantificação da fosfatase alcalina e na fosfatase ácida total e prostática.

Adicionou-se o conteúdo de um frasco de Hidróxido de Sódio 15M (concentrado) a um balão volumétrico de 500ml. Ajustou-se o volume com

água destilada e armazenou-se em frasco plástico. Essa solução permanece estável por 3 anos, à temperatura ambiente (20-30°C). Para o preparo do substrato (35mg de p-Nitrofenilfosfato, sal ciclohexilamina, liofilizado) adicionou-se 10ml de água destilada a cada frasco do mesmo. Essa solução permanece estável por 2 meses se armazenado à temperatura de 2-6°C.

Foram identificados dois tubos de ensaio com B (branco) e C (fosfatase ácida total) e procedido como mostra a Tab. 3.

Tabela3- Preparo dos reagentes para a Fosfatase Ácida Total.

	B	C
Substrato (uso)	0,4ml	0,4ml
Tampão pH 4,8 (0,25M de Citrato Trissódico)	2gotas	2gotas
Colocar em banho-maria, a 37°C.		
Amostra	—	100µl
Incubar a 37°C, durante 30 minutos.		
Hidróxido de Sódio 0,1M	2,5ml	2,5ml

Foi homogeneizado e realizada a leitura em espectrofotômetro (Hitachi U2001), em 410nm, zerando o aparelho com o branco e calibrando com a solução padrão (cada 20µl da mesma correspondia a 28U.I./L de fosfatase ácida).

Tabela 4- Preparo dos reagentes para a Deidrogenase Láctica (DHL)

3.3.4 Atividade da desidrogenase láctica (DHL)

Foi utilizado o kit desidrogenase láctica (DHL, Doles®), o qual utiliza a metodologia de Whitaker modificado (WHITAKER, 1969; DOLES, 1972). A desidrogenase láctica (DHL) é determinada em mistura de reagentes contendo lactato (substrato), diifosfopiridino nucleótico (NAD), fenazina metosulfato (FMS), alumínio férrico e 1,10-fenantrolina. Esse kit modifica a técnica de Whitaker, utilizando a reação lactato piruvato, com determinação quantitativa e simultânea do NADH formado na reação enzimática.

Para o preparo do reagente NAD-FMS abriu-se o frasco envolto em papel rotulado FMS, adicionou-se 3,5ml de água destilada e agitou-se. Foi aberto o frasco conta-gotas e transferido para ele, imediatamente, toda a solução de Fenazina Metosulfato. Foi colocado o batoque conta-gotas e agitado durante alguns minutos até dissolução. Depois de reconstituído, tem-se solução 15,82mmolar de NAD e 3,73mmolar de FMS. Essa solução permanece estável durante dezoito meses, sob refrigeração e ao abrigo da luz. O substrato era uma solução de 0,1M de Lactato, 0,005M de o-Fenantrolina em Tris 0,2M, pH 8,8 a 37°C.

Foram identificados dois tubos de ensaio com T (teste) e B (branco) e procedido como mostra a Tab. 4.

3.4.2 Tabela4- Preparo dos reagentes para a Deidrogenase Láctica (DHL).

	T	B
Substrato	2,0ml	2,0ml
Alúmen Férrico (0,012M de Sulfato de Ferro amoniacal)	2 gotas	2 gotas
Amostra	50 μ l	—
Colocar em banho-maria, a 37°C, de 2 a 3 minutos.		
NAD-FMS	2 gotas	2 gotas
Misturar e incubar a 37°C, durante 5 minutos.		
Solução estabilizadora (Ácido Clorídrico 0,1M)	2,0ml	2,0ml

Foi homogeneizada e realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro (Hitachi U2001), em 510nm, zerando o aparelho com o branco e calibrando com o padrão (cada 50 μ l corresponde a 350U.I. de DHL).

3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão

3.4.1 Obtenção do material

Em diferentes estágios de cultivo, as células foram removidas com auxílio de um bastão de vidro, lavadas três vezes em PBS (centrifugadas a 800rpm por cinco minutos).

3.4.2 Fixação das células

As células da tuba uterina foram fixadas com glutaraldeído/formaldeído 3%, tampão cacodilato (0,1M, pH 7,3) por 30 minutos e lavadas rapidamente em tampão cacodilato com sucrose 2% três vezes (DUARTE *et al.*, 1992).

3.4.3 Pós-fixação das células

No Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2% em tampão s-collidine por 30 minutos.

As amostras foram lavadas rapidamente em tampão cacodilato (0,1M, pH 7,3) com sucrose 2% por três vezes consecutivas e, posteriormente imersas em acetato de uranila em etanol 100% (1:1; concentração final, acetato de uranila 2,5% em etanol 50%) por cinco minutos. E então novamente lavadas rapidamente em etanol 70% por três vezes.

3.4.4 Desidratação

As amostras coradas foram desidratadas em 2,2-dimetoxipropano acidificado com 0,05ml de HCl (1M/100ml) por 5 minutos e em acetona 100% com sulfato de cobre anidro por 2 minutos.

3.4.5 Infiltração

As amostras foram infiltradas com acetona 100% em Epon e Araldite 502 (1:1) por 30 minutos e embebidas duas vezes em Epon 812 e Araldite 502 por 10 minutos. A polimerização foi executada em 100°C por 60 minutos.

3.4.6 Trimagem

Os blocos foram primeiramente trimados com o auxílio de uma lâmina metálica (Gillette®) e sob microscópio estereoscópico do ultramicrotomo (MT@B-Sorvall®).

Esse método visava à retirada do excesso de resina em torno da peça incluída, bem como a obtenção de uma superfície, sobre a qual os cortes iam incidir, o mais plana possível.

3.4.7 Cortes semifinos e ultrafinos

Cortes semi e ultrafinos foram obtidos em temperatura ambiente em ultramicrotomo (MT2-B, Sorvall®). Estes foram corados com acetato de uranila 7% em metanol e então com citrato de chumbo. O tempo de processamento foi de 2 horas e 20 minutos.

3.4.8 Análises e documentação

Os exames dos cortes ultrafinos e documentação fotográfica foram realizados em microscópio eletrônico Jeol JM 1010® do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Philips 301® do Instituto do Coração (INCOR).

3.5. Morfometria

3.5.1 Avaliação da densidade de volume - estimativa do número total de pontos necessários para avaliação da densidade de volume pelo método de contagem de pontos, para se obter um nível de erro pré-determinado (erro padrão relativo)

O método de contagem de pontos para avaliações de densidade de volume (Vv_i) de um dado componente (i) dentro de um continente, a partir de preparações bidimensionais, como sejam, por exemplo, superfícies de corte de um material, pode ser feito através da aplicação de um sistema teste sobre o material em estudo.

Esse sistema teste apresenta um determinado número de pontos, regularmente espaçados, dentro de uma área delimitada (quadrática ou retangular) e, de acordo com o tipo de preparação a ser analisada (eletromicrografias), foi um retículo impresso em plástico transparente para superposição nas mesmas.

3.5.2 Aplicando-se o sistema teste sobre um número determinado de campos de observação foi possível proceder à contagem de pontos (p_i) incidentes sobre o componente em estudo, e o total de pontos (P) incidentes sobre o seu continente.

A densidade de volume, ou fração de volume que o componente (i) ocupa é estimada pela relação: $V_{vi} = p_i / p$

Foi necessário estimar o número mínimo de pontos do sistema teste utilizado que deveria incidir sobre as superfícies de corte do material, a fim de se obter um nível de erro pré-determinado. Isso correspondeu a estimar em quantos campos de observação, tomados ao acaso, deveria ser aplicado o sistema teste.

O total de pontos necessários foi dado pela fórmula: $P = 1 - p_p / e^2 \cdot p_p$

Onde:

P = número total de pontos sobre o continente

P_p = estimativa prévia da densidade de volume de uma dada estrutura no continente, feita através de um número limitado de pontos do sistema teste.

E = erro padrão relativo que se desejava ter associado à estimativa da densidade de volume.

A partir da fórmula anterior, também se pode calcular o erro padrão relativo associado a estimativas de densidade de volume feitas pelo método de contagem de pontos em um determinado número de campos de observação onde se tenha aplicado o sistema teste.

$$e = 1 - p_p / p \cdot p_p$$

3.5.2 Procedimentos para estudos morfométricos de componentes celulares das células epiteliais da tuba uterina ao microscópio eletrônico

As análises quantitativas para avaliações de parâmetros estereológicos de estruturas celulares foram feitas em eletromicrografias do material preparado como descrito em 3, tomadas com a câmara do microscópio eletrônico Philips 301®. Os procedimentos gerais para as avaliações que se seguem nos demais subtítulos foram os seguintes:

Nos dias zero, um, quatro, sete e dez obteve-se, ao acaso, cerca de 20 eletromicrografias de células secretoras, ciliadas e da monocamada, com aumento final, após ampliação de sete vezes, de 14.000 e 38.500 vezes. Esses aumentos foram estabelecidos por permitirem identificação precisa das estruturas a serem avaliadas, dentro de uma área de exame, a maior possível.

Um sistema teste, tipo FREERE-WEIBEL (1967) *apud* AHERNE e DUNNILL (1982) impresso em plástico transparente – representando uma área retangular onde estão distribuídos regularmente, em quatorze níveis paralelos, oitenta e quatro segmentos de reta de comprimento (L) conhecido, cujas extremidades somam um total de cento e sessenta e oito pontos – foi utilizado para a estimativa dos parâmetros morfométricos. A cada ponto do sistema teste estava associada uma área que variava conforme o aumento da eletromicrografia.

p_i = número total de pontos sobre o citoplasma da célula.

Aplicando o sistema teste sobre as eletromicrografias, pode-se contar, sobre a célula secretora, ciliada e da monocamada:

- a) número de pontos (p) (incidências das extremidades dos segmentos) sobre os perfis de cada uma das seguintes estruturas celulares: núcleo, grânulos de secreção, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, aparelho de Golgi e outras estruturas (ribossomos livres, lisossomos primários e secundários, vacúolos eletrodensos, grânulos de natureza não identificada, etc);
- b) número de intersecções ou cruzamentos (C), que os segmentos do sistema teste fazem com as membranas limitantes das estruturas citadas acima;
- c) número total de pontos (p_t) sobre a célula secretora, ciliada e da monocamada.
- d)

3.5.3 Avaliação da densidade de volume dos componentes celulares da célula secretora, ciliada e da monocamada

As densidades de volume (V_v) do núcleo, grânulos de secreção, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, aparelho de Golgi e outras estruturas no citoplasma da célula secretora, ciliada e da monocamada, foram calculadas pela seguinte relação: $V_v = p_i / p_t$, onde:

p_i = número de pontos do sistema teste sobre a estrutura i em estudo.

p_t = número total de pontos sobre o citoplasma da célula.

Os valores de p_i e p_t foram obtidos como indicado em 3.5.2.

3.6 Análise Estatística

As médias, desvio padrão e grau de significância ($p < 0,005$) da cinética de crescimento celular e análise bioquímica foram calculados através do teste t-Student (teste de distribuição paramétrica) para dados que seguem uma curva normal. Quanto aos dados da análise morfométrica, por serem expressos em porcentagem e não terem distribuição normal, foram analisados pelo teste de Mann-Whitney (teste de distribuição não paramétrica).

RESULTADOS

4.1. Cultivo da Tuba Uterina

Tanto o cultivo na presença de SFB quanto na ausência de SFB apresentaram dois tipos de células: as ciliares e as secretoras que foram gradualmente diferenciando-se durante o cultivo.

Nas primeiras horas de cultivo, as células apresentaram uma tendência a formerem cordões ou agregados celulares (Fig.1). No D1, esses agregados formavam vesículas com intenso movimento ciliar (Fig.2). A partir do D4, a monocamada começava a ser formada em ambos os cultivos, sendo que o batimento ciliar era pouco observado. O cultivo na presença de SFB apresentou uma monocamada confluenta no dia cinco (D5; Fig.3), enquanto na ausência de SFB não houve confluência até o D10 (Fig.4). Algumas células permaneceram em suspensão em ambos os cultivos até o final do experimento e mantiveram as suas características morfológicas originais.

RESULTADOS

4.1. Cultivo da Tuba Uterina

Tanto o cultivo na presença de SFB quanto na ausência de SFB apresentaram dois tipos de células: as ciliares e as secretoras que foram gradativamente diferenciando-se durante o cultivo.

Nas primeiras horas de cultivo, as células apresentaram uma tendência a formarem cordões ou agregados celulares (Fig.1). No D1, esses agregados formavam vesículas com intenso movimento ciliar (Fig.2). À partir do D4, a monocamada começava a ser formada em ambos os cultivos, sendo que o batimento ciliar era pouco observado. O cultivo na presença de SFB apresentou uma monocamada confluenta no dia cinco (D5; Fig.3), enquanto na ausência de SFB não houve confluência até o D10 (Fig.4). Algumas células permaneceram em suspensão em ambos os cultivos até o final do experimento e mantiveram as suas características morfológicas originais.

Figura2- Células epiteliais da tuba uterina de bovinos no D4 de cultivo.

Aumento de 40x. Barra=1,37cm, 5µm.

Figura1- Células epiteliais da tuba uterina de bovinos no D1 de cultivo.

Aumento de 40x. Barra=1,37cm, 5 μ m.

Figura2- Células epiteliais da tuba uterina de bovinos no D4 de cultivo.

Aumento de 40x. Barra=1,37cm, 5 μ m.

Figura 3 - Monocamada confluyente de células epiteliais da tuba uterina de bovinos na presença de SFB no D7. Aumento de 40x. Barra=1,37cm, 5 μ m.

Figura 4 - Células epiteliais da tuba uterina de bovinos na ausência de SFB no D10. Aumento de 40x. Barra=1,37cm, 5 μ m.

4.2. Efeitos do Soro Fetal Bovino Sobre a Cinética de Crescimento Celular

Segundo a análise estatística apresentada na Tab. 1 e Graf.1, houve uma inibição do crescimento das células cultivadas na ausência de SFB em relação às células na presença do mesmo em todos os pontos, sendo que o D1 não foi significativo. Cada coluna representa a média de 14 frascos.

Tabela 1 – Efeitos do SFB sobre a cinética de crescimento celular – São Paulo - 2001

	D1		D2		D3	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Com SFB	21,21	1,25	36,57	2,50	52,86	3,21
Sem SFB	21,14	1,10	32,86	2,60	40,64	2,10

Comparações de médias segundo o teste t-Student.

Comparação	D1		D2		D3	
	t	P	t	P	t	P
	0,160	0,874	3,853	0,001*	11,925	0,000*

Obs: * significativa para $p < 0,05$.

Gráfico 1 - Efeitos do SFB sobre a cinética de crescimento celular na sua presença (A) ou ausência (B) – São Paulo - 2001

4.3. Análise Bioquímica

4.3.1 Consumo de glicose

Segundo a análise estatística apresentada na Tab. 2 e Graf.2, o consumo de glicose diminuiu em ambos os cultivos no decorrer dos dias e apenas nos D4 e D7 observou-se diferença significativa. Cada coluna representa a média de 15 amostras.

Tabela 2 - Consumo de glicose na ausência e presença de SFB (SFB) – São Paulo - 2002

	D1		D4		D7		D10	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Com SFB	1,27967	0,21826	0,52280	0,27984	0,16073	0,09474	0,024	0,01766
Sem SFB	1,14847	0,26102	0,95680	0,28509	0,59800	0,09214	0,02326	0,015609

Comparações de médias segundo o teste t-Student.

Comparação	D1		D4		D7		D10	
	t	P	t	P	t	P	t	P
Sem SFB	1,493	0,147	-4,208	0,000*	-12,814	0,000*	0,120	0,905

Obs: * significativa para $p < 0,05$.

Comparações de médias segundo o teste t-Student.

Gráfico 2 - Consumo de glicose na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo

4.3.2 Atividade protéica

A Fig.4 mostra que. Segundo a análise estatística apresentada na Tab. 3 e Graf.3, a atividade protéica aumentou até o D7 e diminuiu no dia 10 em ambos os cultivos e apenas no D4 não foi observada diferença significativa. Cada coluna representa a média de 15 amostras.

Tabela 3 - Atividade protéica na ausência e presença de SFB (SFB) – São Paulo - 2001

	D1		D4		D7		D10	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Com SFB	0,46200	0,08169	0,53233	0,05429	0,6103	0,06536	0,38567	0,06907
Sem SFB	0,35607	0,04945	0,49213	0,09141	0,5405	0,06489	0,45527	0,04619

Comparações de médias segundo o teste t-Student.

	D1		D4		D7		D10	
Comparação	t	P	t	P	t	P	t	P
	4,296	0,000*	1,464	0,157	2,935	0,007*	-3,244	0,003*

Obs: * significativa para $p < 0,05$.

Gráfico 3 - Atividade protéica na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2001

4.3.3 Atividade da fosfatase ácida

Segundo a análise estatística apresentada na Tab. 4 e Graf.4, observou-se um aumento na atividade da fosfatase ácida em ambos os

cultivo e diferença significativa em todos os dias de cultivo. Cada coluna representa a média de 15 amostras.

Segundo a análise estatística apresentada na Tab. 4 e Gráfico 4,

Tabela 4 - Atividade da fosfatase ácida na ausência e presença de SFB
(SFB) – São Paulo - 2001

	D1		D4		D7		D10	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Com SFB	0,10980	0,0079	0,11887	0,00627	0,12553	0,0046	0,13473	0,00745
Sem SFB	0,12827	0,01145	0,13907	0,01162	0,15340	0,01238	0,17687	0,05924

Comparações de médias segundo o teste t-Student.

	D1		D4		D7		D10	
Comparação	t	P	t	P	t	P	t	P
	-5,139	0,000*	-5,920	0,000*	-8,173	0,000*	-2,733	0,000*

Obs: * significativo para $p < 0,05$.

Gráfico 4 - Atividade da fosfatase ácida na presença (A) e ausência (B) de
SFB – São Paulo - 2001

4.3.4 Atividade da deidrogenase láctica (DHL)

Segundo a análise estatística apresentada na Tab. 5 e Graf.5, observou-se que houve um aumento na atividade da deidrogenase láctica em ambos os cultivos e diferença significativa em todos os dias de cultivo. Cada coluna representa a média de 15 amostras.

Gráfico 5 - Atividade da deidrogenase láctica na presença (A) e ausência

Tabela 5 - Atividade da deidrogenase láctica na ausência e presença de SFB
– São Paulo - 2001

	D1		D4		D7		D10	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Com SFB	0,10967	0,00729	0,11887	0,00627	0,13260	0,00392	0,13473	0,00745
Sem SFB	0,12053	0,01439	0,13907	0,01162	0,15127	0,01963	0,17687	0,05924

Comparações de médias segundo o teste t-Student.

Comparação	D1		D4		D7		D10	
	t	P	t	P	t	P	t	P
	-2,608	0,017*	-5,920	0,000*	-3,611	0,003*	-2,733	0,000*

Obs: * significativo para $p < 0,05$.

morfológicas iniciais até o último dia de experimento tanto na presença quanto na ausência de SFB.

As células aliadas caracterizaram-se por apresentarem grande número de mitocôndrias, cílios e presença de corpos basais nos primeiros dias de cultivo (Fig. 5 e 6). Esses cílios permaneceram até o D10, em ambos cultivos, mas em menor número. O retículo endoplasmático rugoso não era

Gráfico 5 - Atividade da deidrogenase láctica na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2001

4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Nos primeiros dias de cultivo, tanto na presença ou na ausência de SFB pudemos encontrar dois tipos celulares: as ciliadas e as secretoras. À medida que a monocamada vai se formando essas células diferenciaram-se apresentando microvilosidades, mas ainda encontramos, mesmo que em menor número, as células ciliadas e secretoras suspensas no meio de cultivo, formando vesículas de diferentes tamanhos. Essas células suspensas no meio de cultivo mantiveram suas características morfológicas iniciais até o último dia de experimento tanto na presença, quanto na ausência de SFB.

As células ciliadas caracterizaram-se por apresentarem grande número de mitocôndrias, cílios e presença de corpos basais nos primeiros dias de cultivo (Fig. 5 e 6). Esses cílios permaneceram até o D10, em ambos cultivos, mas em menor número. O retículo endoplasmático rugoso não era

muito desenvolvido e o núcleo ocupava grande parte da célula. Após alguns dias de cultivo, pode-se observar a presença de microvilos. Algumas células dos D7 e D10, provavelmente ciliadas, apresentaram, além dos corpos basais, vacúolos com componentes ciliares (Fig. 7). Em ambos os dias de cultivo observou-se a presença de desmossomos entre as células (Fig. 7)

Quanto às células secretoras, além dos grânulos de secreção de diferentes densidade e tamanho estarem bem característicos na região apical da célula, podemos notar um ou dois aparelhos de Golgi e o retículo endoplasmático granular bem desenvolvido, assim como presença de mitocôndrias, poliribossomos, ribossomos livres e desmossomos (Fig. 7, 8 e 9). O núcleo ocupava uma grande área da célula até o D7.

A monocamada era formada por células diferenciadas com presença de microvilos e desmossomos. Inicialmente, notamos alguns cílios que logo foram substituídos por microvilos. Não foram encontrados cílios, corpos basais ou mesmo grânulos de secreção tanto na presença, quanto na ausência de SFB, nos D7 e D10, mas pode-se observar a presença de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi (Fig. 10).

No D10, notamos um grande número de células degeneradas que apresentavam grande número de vacúolos, pouco número de mitocôndrias e um núcleo com cromatina compacta em algumas regiões (Fig. 11).

Figura 5 – Célula ciliada do D4 na presença de SFB. Cílios (seta); núcleo (N). Aumento de 10.400 X.

Figura 6 – Célula ciliada do D1 na ausência de SFB. Notar a presença dos cílios (a) e dos corpos basais (b). Aumento de 21.840 X.

Figura 7 – Célula secretora do D7 na ausência de SFB. Notar a presença de grânulo de secreção (G); desmossomos (seta); vacúolos com restos ciliares (V); núcleo (N) e mitocôndrias. Aumento de 17.160 X.

Figura 8 – Célula secretora no D7 na presença de SFB. Notar a presença do núcleo (N); grânulos de secreção (G); retículo endoplasmático granular (R); ribossomos (P) e mitocôndrias (M). Aumento de 17160 X.

Figura 9 – Célula secretora do D7 na ausência de SFB. Notar o retículo endoplasmático granular bem desenvolvido (R); núcleo (N) e grânulos de secreção (G). Aumento de 28.600 X.

Figura 10 – Célula da monocamada do D7 na presença de SFB. Notar a presença dos microvilos (seta); núcleo (N); mitocôndrias (M) e ribossomos (R). Aumento de 17160 X.

4.5 Morfometria

aumentando no D10 tanto no cultivo na presença de SFB quanto na sua

Figura 11 – Célula da monocamada do D10 na ausência de SFB. Núcleo (N) com regiões de cromatina condensada (seta) e vacúolos (V).
(Tab. 6).
Aumento de 8.320 X.

4.5 Morfometria

4.5.1 Célula secretora

De acordo com a análise estatística, observou-se que o núcleo das células na presença de SFB aumentou de tamanho até o D7, diminuindo no D10, enquanto na ausência de SFB diminuiu no D1, aumentando de tamanho até o D7, para voltar a diminuir no D10 (Tab. 6, Graf.6). Os resultados foram significantes nos D1, D4 e D10 (Tab. 6).

Os grânulos de secreção, o retículo endoplasmático granular, as mitocôndrias e o aparelho de Golgi aumentaram até o D7, voltando a diminuir no D10 em ambos os cultivos (Tab. 6; Graf.7, 8, 9, 10). De acordo com a análise estatística apresentada na Tab. 6 os registros relativos aos dias D1, D7 e D10 foram significativos.

As outras estruturas citoplasmáticas diminuíram até o D7, aumentando no D10 tanto no cultivo na presença de SFB, quanto na sua ausência (Tab. 6, Graf. 11). Os resultados foram significantes nos D7 e D10 (Tab. 6).

Tabela 6 –Relações percentuais (média) das células secretoras da tuba uterina cultivadas na presença e na ausência de SFB – São Paulo - 2002

		D0		D1		D4		D7		D10	
		Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Núcleo	Com SFB	33,4	0,9403	34,2	1,1050	37,2	1,2814	39,2	1,6416	32,2	1,1965
	Sem SFB	33,4	0,9403	33,2	1,1050	35,9	1,3338	38,2	1,1965	30	1,0260
Grânulo de secreção	Com SFB	19,8	1,5079	21,7	1,4546	29,4	1,6670	33,4	0,9403	13,5	2,8377
	Sem SFB	19,8	1,5079	20,5	1,5390	28,5	1,3179	30,7	1,5927	11,4	2,0105
Retículo endoplasmático rugoso	Com SFB	6,6	1,0463	7,8	1,0052	10,1	1,2524	9,8	1,1050	5,1	0,9679
	Sem SFB	6,6	1,0463	6,7	0,9234	9,2	1,2814	8,8	1,0052	4,3	0,9234
Mitocôndria	Com SFB	5,8	0,8944	8,8	1,0052	10,8	1,2814	11,2	1,2814	6,6	1,0463
	Sem SFB	5,8	0,8944	8,4	1,1425	10,7	1,3018	10,7	0,8013	6,4	0,9403
Aparelho de Golgi	Com SFB	3,9	0,9679	5,6	1,0463	6,8	0,8944	8,5	0,6882	5	0,7947
	Sem SFB	3,9	0,9679	4,4	0,9403	5,8	0,8944	7,4	0,8208	3,5	0,8272
Outras estruturas citoplasmáticas	Com SFB	30,5	1,9057	24,9	3,4473	8,7	2,9397	1,4	0,5026	40,6	4,0833
	Sem SFB	30,5	1,9057	26,4	2,3486	9,8	2,1667	2,7	0,8013	43,8	1,8238

Comparações de médias segundo o teste Mann-Whitney

	D0	D1	D4	D7	D10
Núcleo	1,000	0,009*	0,007*	0,121	0,000*
Grânulo de secreção	1,000	0,023*	0,086	0,000*	0,017*
Reticulo endoplasmático rugoso	1,000	0,002*	0,052	0,003*	0,023*
Mitocôndria	1,000	0,289	0,799	0,183	0,529
Aparelho de Golgi	0,841	0,001*	0,002*	0,000*	0,000*
Outras estruturas citoplasmáticas	1,000	0,086	0,174	0,000*	0,014*

Obs: * significativa para $p < 0,05$.

Gráfico 6 – Porcentagem da dimensão do núcleo na célula secretora na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

Gráfico 7 – Porcentagem dos grânulos de secreção na célula secretora na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo- 2002

Gráfico 8 – Porcentagem do retículo endoplasmático granular na célula secretora na presença (A) e ausência (B) de SFB - São Paulo - 2002

Gráfico 9 – Porcentagem das mitocôndrias na célula secretora na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

Gráfico 10 – Porcentagem do aparelho de Golgi na célula secretora na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

(Tab. 7, Graf. 14). De acordo com a análise estatística apresentada na Tab.

Gráfico 11 – Porcentagem das outras estruturas citoplasmáticas na célula secretora na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

4.5.2 Célula ciliada

De acordo com a análise estatística apresentada na Tab7 e Graf. 12, observou-se que o núcleo das células na presença e ausência de SFB aumentou de tamanho até o D4 , diminuindo no D7 até o D10 . Os resultados não foram significantes em todo o tempo de cultivo (Tab. 7).

O retículo endoplasmático granular na presença de SFB apresentou um aumento nos D1 e D7, diminuindo no D4 e D10, sendo que na ausência de SFB manteve a mesma porcentagem até o D4, aumentando no D7 e diminuindo no D10 (Tab. 7, Graf. 13). Os resultados não foram significantes em todo o tempo de cultivo (Tab. 7).

Em relação às mitocôndrias, observou-se um aumento até o D7 e diminuição no D10 na presença de SFB, enquanto que na ausência de SFB houve uma diminuição no D1, aumento nos D4 e D7 diminuição no D10

(Tab. 7, Graf. 14). De acordo com a análise estatística apresentada na Tab. 7, os D1, D4 e D7 foram significativos.

Os dados apresentados na Tab. 7 e Graf. 15 mostraram que o aparelho de Golgi aumentou no D1, diminuindo no D4 e D7 e mantendo-se no D10 em ambos os cultivos. Os resultados não foram significantes em todo o tempo de cultivo (Tab. 7).

As outras estruturas citoplasmáticas diminuíram até o D7, aumentando no D10 na presença de SFB, enquanto na sua ausência houve um aumento no D1, D7 e D10 e diminuição no D4 (Tab. 7, Graf. 16). Os resultados foram significantes nos dias D1, D4, D7 e D10 (Tab. 7).

	D0		D1		D4		D7	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Núcleo	Com SFB	48,15	0,0127	48,75	0,0007	48,45	48,45	0,0007
	Sem SFB	48,15	0,0127	48,75	0,0007	48,45	48,45	0,0007
Retículo endoplasmático rugoso	Com SFB	4,45	0,5104	4,5	0,5025	4,5	4,5	0,5104
	Sem SFB	4,45	0,5104	4,45	0,5104	4,5	4,5	0,5104
Mitochondria	Com SFB	10,25	1,5003	17,00	1,5002	10,55	10,55	1,5003
	Sem SFB	10,25	1,5003	15,25	1,5002	10,55	10,55	1,5003
Aparelho de Golgi	Com SFB	3,4	0,0000	3,5	0,0000	3,5	3,5	0,0000
	Sem SFB	3,4	0,0000	3,5	0,0000	3,5	3,5	0,0000
Outras estruturas citoplasmáticas	Com SFB	25,3	1,0007	27,75	2,0003	25,35	25,35	2,0003
	Sem SFB	25,3	1,0007	27,00	2,0002	25,3	25,3	2,0002

Tabela 7 – Relações percentuais (média) das células ciliadas da tuba uterina cultivadas na presença e na ausência de SFB –

São Paulo - 2002

		D0		D1		D4		D7		D10	
		Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Núcleo	Com SFB	46,15	0,8127	46,75	0,8507	48,45	0,7592	47,45	0,7592	38,30	0,9787
	Sem SFB	46,15	0,8127	46,75	0,8507	48,25	0,9665	47,45	0,7592	38,30	0,9787
Retículo endoplasmático rugoso	Com SFB	4,45	0,5104	4,6	0,5026	4,55	0,5104	4,75	0,7864	3,8	0,8944
	Sem SFB	4,45	0,5104	4,45	0,5104	4,5	0,5130	4,65	0,9333	3,8	0,8944
Mitocôndria	Com SFB	14,25	1,5853	17,80	1,6092	18,55	1,4681	19,25	1,5174	15,75	2,4252
	Sem SFB	14,25	1,5853	13,80	1,6092	14,65	1,4609	15,25	1,3328	11,20	2,3530
Aparelho de Golgi	Com SFB	3,4	0,5026	3,5	0,5130	3,5	0,5130	3,45	0,5104	3,45	0,5104
	Sem SFB	3,4	0,5026	3,5	0,5130	3,5	0,5130	3,45	0,5104	3,45	0,5104
Outras estruturas citoplasmáticas	Com SFB	28,9	1,9167	27,35	2,0333	25,95	3,6917	25	2,1764	38,7	2,0545
	Sem SFB	28,9	1,9167	30,09	2,6137	27,9	1,4105	28	2,1764	43,25	2,1491

Comparações de médias segundo o teste Mann-Whitney

	D0	D1	D4	D7	D10
Núcleo	1,000	1,000	0,583	1,000	1,000
Retículo endoplasmático rugoso	1,000	0,425	0,799	0,689	1,000
Mitocôndria	1,000	0,000*	0,000*	0,000*	1,000
Aparelho de Golgi	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Outras estruturas citoplasmáticas	1,000	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*

Obs: * significativa para $p < 0,05$.

Gráfico 12 – Porcentagem da dimensão do núcleo na célula ciliada na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

Gráfico 13 – Porcentagem do retículo endoplasmático rugoso na célula ciliada na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

Gráfico 14 – Porcentagem das mitocôndrias na célula ciliada na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

4.5.3 Célula de mucociliada

Gráfico 15 – Porcentagem do aparelho de Golgi na célula ciliada na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

Gráfico 16 – Porcentagem das outras estruturas do citoplasma na célula ciliada na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

4.5.3 Célula da monocamada

De acordo com a análise estatística apresentada na Tab. 8 e Graf. 17, 18 e 19, a porcentagem da dimensão do núcleo, retículo endoplasmático rugoso e das mitocôndrias, na presença e ausência de SFB, aumentou até o D7 e diminuiu no D10. Em relação ao núcleo e mitocôndrias todos os dias de cultivo foram significantes, enquanto o retículo endoplasmático rugoso não apresentou significância em nenhum dos dias de cultivo (Tab. 8).

O aparelho de Golgi diminuiu até o D10 em ambos os cultivos (Tab. 8, Graf. 20). De acordo com a análise estatística apresentada na Tab. 8, não houve significância em nenhum dos dias do experimento.

As outras estruturas citoplasmáticas diminuíram até o D7 e aumentaram no D10, na presença e ausência de SFB (Tab. 8, Graf. 21). Em todos os dias do experimento observou-se significância (Tab. 8).

	Com SFB	25.5	0.000*	22.5	0.000*	24.2	0.000*
	Sem SFB	32.5	2.000*	24.25	0.000*	26.5	0.000*
Núcleo							
Retículo endoplasmático rugoso							
Mitocôndria							
Aparelho de Golgi							
Outras estruturas citoplasmáticas							

Obs. * significativo para $p < 0,05$.

Tabela 8 – Relações percentuais (média) das células da monocamada da tuba uterina cultivadas na presença e na ausência de SFB – São Paulo - 2002

		D4		D7		D10	
		Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Núcleo	Com SFB	46,8	1,9358	49,65	2,0072	43,80	1,9084
	Sem SFB	44,8	1,9358	47,4	1,7290	41,70	2,0026
Retículo endoplasmático rugoso	Com SFB	4,55	0,5104	4,75	0,7864	3,8	0,8944
	Sem SFB	4,5	0,5130	4,65	0,9333	3,95	1,099
Mitocôndria	Com SFB	18,55	1,4681	19,25	1,5174	15,75	2,4252
	Sem SFB	14,65	1,4609	15,25	1,3328	11,35	2,4339
Aparelho de Golgi	Com SFB	3,5	0,5130	3,45	0,5104	2,6	0,5982
	Sem SFB	3,5	0,5130	3,45	0,5104	2,45	0,5104
Outras estruturas citoplasmáticas	Com SFB	26,6	2,2337	22,9	2,6137	34,2	2,7834
	Sem SFB	32,5	2,2827	29,25	2,1244	40,4	2,5005

Comparações de médias segundo o teste Mann-Whitney.

	D4	D7	D10
Núcleo	0,002*	0,001*	0,002*
Retículo endoplasmático rugoso	0,799	0,698	0,779
Mitocôndria	0,000*	0,000*	0,000*
Aparelho de Golgi	1,000	1,000	0,512
Outras estruturas citoplasmáticas	0,000*	0,000*	0,000*

Obs: * significante para $p < 0,05$.

Gráfico 17 – Porcentagem da dimensão do núcleo na célula da monocamada na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

Gráfico 18 – Porcentagem do retículo endoplasmático rugoso na célula da monocamada na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

Gráfico 19 – Porcentagem das mitocôndrias na célula da monocamada na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

Gráfico 20 – Porcentagem do aparelho de Golgi na célula da monocamada na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

Gráfico 21 – Porcentagem das outras estruturas do citoplasma na célula da monocamada na presença (A) e ausência (B) de SFB – São Paulo - 2002

DISCUSSÃO

A tuba uterina é um importante órgão na reprodução dos mamíferos, onde ocorrem diversos eventos, tais como: transporte dos gametas, capacitação espermática, fecundação e desenvolvimento dos primeiros estágios do embrião. As interações entre as células epiteliais da tuba uterina e gametas ou embriões não têm sido muito bem estudadas, tornando-se importante a utilização de um modelo *in vitro* que mimetize as condições *in vivo*.

Neste trabalho, as células da tuba uterina de bovinos foram obtidas através da técnica de isolamento mecânico, descrito por EYESTONE e FIRST (1989), pois além de ser de fácil manuseio e pouco oneroso, não apresenta contaminação por outros tipos celulares e nem injúria da lâmina própria da tuba uterina, o que pode ocorrer quando as células são obtidas por isolamento enzimático (WALTER, 1995; VAN LANGENDONCKT *et al.*, 1995).

Através da microscopia de luz, notamos dois tipos celulares, as células ciliadas e as secretoras não ciliadas que foram gradualmente diferenciando-se durante todo o tempo de cultivo, na presença e na ausência de SFB. A diferença primordial deste método foi a presença de uma maior quantidade de fragmentos do epitélio e menor de células isoladas, diferindo dos resultados obtidos por JOSHI (1995), quando utilizou colagenase a 0,1%.

DISCUSSÃO

Quanto ao desenvolvimento das células epiteliais da tuba uterina *in vitro* com soro, quando observadas ao microscópio de luz invertida, não apresentaram grandes diferenças quando comparadas ao relato de outros

A tuba uterina é um importante órgão na reprodução dos mamíferos, onde ocorrem diversos eventos, tais como: transporte dos gametas, capacitação espermática, fecundação e desenvolvimento dos primeiros estágios do embrião. As interações entre as células epiteliais da tuba uterina e gametas ou embriões não têm sido muito bem estudadas, tornando-se importante à utilização de um modelo *in vitro* que mimetize as condições *in vivo*.

Neste trabalho, as células da tuba uterina de bovinos foram obtidas através da técnica de isolamento mecânico, descrito por EYESTONE e FIRST (1989), pois além de ser de fácil manuseio e pouco oneroso, não apresenta contaminação por outros tipos celulares e nem injúria da lâmina própria da tuba uterina, o que pode ocorrer quando as células são obtidas por isolamento enzimático (WALTER, 1995; VAN LANGENDONCKT *et al.*, 1995).

Através da microscopia de luz, notamos dois tipos celulares, as células ciliadas e as secretoras não ciliadas que foram gradativamente diferenciando-se durante todo o tempo de cultivo, na presença e na ausência de SFB. A diferença primordial deste método foi a presença de uma maior quantidade de fragmentos do epitélio e menor de células isoladas, diferindo dos resultados obtidos por JOSHI (1995), quando utilizou colagenase a 0,1%.

Quanto ao desenvolvimento das células epiteliais da tuba uterina *in vitro* com soro, quando observadas ao microscópio de luz invertida, não apresentaram grandes diferenças quando comparadas ao relato de outros

autores (JOSHI, 1988; HISHINUMA *et al.*, 1989; THIBODEAUX *et al.*, 1992; VAN LANGENDONCKT *et al.*, 1995; JOSHI, 1995; WALTER, 1995; GÓMEZ e URÍA, 1997; REISCHL *et al.*, 1999; GONÇALVES *et al.* 1999). As células cultivadas na ausência de soro diferiram das anteriores por apresentarem uma inibição no crescimento celular e ausência de uma monocamada confluyente, ao contrário dos resultados relatados por VAN LANGENDONCKT *et al.* (1995) que não observaram diferenças entre os dois grupos, talvez por terem cultivado as células primeiro com soro por uma semana para então retirar o soro do meio.

Em relação à microscopia eletrônica de transmissão, as células na presença de SFB tiveram desenvolvimento semelhante às relatadas por outros autores (JOSHI, 1988; HISHINUMA *et al.*, 1989; VAN LANGENDONCKT *et al.*, 1995; JOSHI, 1995; WALTER, 1995; GÓMEZ e URÍA, 1997; REISCHL *et al.*, 1999), isto é, presença de dois tipos celulares no início do cultivo, ciliadas e secretoras, que foram gradativamente diferenciando-se durante o cultivo, formando uma monocamada de células com microvilos. Descrição também observada por GONÇALVES *et al.* (1999), ao microscópio eletrônico de varredura.

A contínua presença de cílios das células solta no meio de cultivo é desconhecida. De acordo com HISHINUMA *et al.* (1989), esses grumos de células ciliadas e secretoras teriam a finalidade de transportar substâncias secretadas pelas células e pelo meio de cultivo por toda a monocamada. A presença dos microvilos também está associada ao aumento da superfície da membrana celular, mas julgamos oportuno um estudo mais detalhado

para que se possa entender o papel de alguns hormônios ou fatores envolvidos neste processo.

De um modo geral as características morfológicas foram preservadas tanto na presença quanto na ausência de SFB. Notamos a presença de células ciliadas com um grande número de mitocôndrias, cílios e corpos basais; células secretoras com grânulos de secreção de diferentes tamanhos e densidades e um ou dois aparelhos de Golgi, assim como o retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido; células da monocamada com microvilos, desmossomos e mitocôndrias bem características. O que não pudemos observar, a princípio, quando comparamos os dados morfométricos. Ambas as células apresentaram diferenças significativas na presença e ausência de SFB quando comparados com alguns parâmetros e em determinados dias. As células secretoras apresentaram diferenças significativas em relação às percentagens entre as organelas celulares, tais como: núcleo, grânulos de secreção, aparelho de Golgi e outras estruturas citoplasmáticas nos principais dias de cultivo. Quanto às células ciliadas, apresentaram diferenças em relação às mitocôndrias e outras estruturas citoplasmáticas. Já as células presentes na monocamada foram significantes em relação a núcleo, mitocôndrias e outras estruturas citoplasmáticas.

Quando analisamos alguns parâmetros bioquímicos, em relação ao consumo de glicose observou-se que ambos os cultivos apresentaram queda nos valores de glicose no meio, sendo que, as médias dos valores nos dias quatro e sete foram menores na presença de SFB, provavelmente,

porque essas estavam em fase logarítmica de crescimento (MCATEER e DAVIS, 1994).

Em relação à atividade protéica, o cultivo na presença de SFB, em todos os dias, apresentou uma média dos valores maiores do que na ausência de soro, sendo que apenas no dia quatro não houve significância. Tal fato pode ser devido à presença de aminoácidos e proteínas no soro, o que causaria essa diferença, ou pelo simples fato de as células na presença de soro terem um aumento em seu número e síntese protéica. Esses dados divergem dos relatados por VAN LANGENDONCKT et al. (1995), que não observaram diferença no cultivo na presença e na ausência de soro, talvez porque as células somente foram cultivadas sem soro após uma semana com soro.

Tanto a fosfatase ácida, quanto a desidrogenase láctica, aumentaram em ambos os cultivos, sendo que a média dos valores em todos os dias foi maior na ausência de soro. A fosfatase ácida é uma enzima lisossômica que hidrolisa a ligação éster de ésteres fosfato e participa dos processos de autólise celular; o aumento da sua atividade, assim como o da desidrogenase láctica, têm sido utilizados como indicadores de processos patológicos celulares (ACOSTA et al., 1980; AGARWAL et al., 1978; GREEN et al., 1981). Desse modo, provavelmente o cultivo na ausência de soro causa maiores danos celulares, levando à ruptura da membrana lisossômica e a liberação da fosfatase ácida no citoplasma e no meio de cultivo, assim como o aumento da desidrogenase láctica no meio.

As linhagens celulares permanentes têm como principais vantagens à ótima reprodutibilidade, a facilidade de manutenção e o controle de qualidade assegurado pelos fornecedores, principalmente no que se refere à presença de contaminantes e endotoxinas. Porém, deve-se levar em consideração que, assim como ocorre em todos os tipos de cultivo *in vitro*, a sua manipulação deve seguir critérios rigorosos que evitem a contaminação posterior no ambiente do laboratório. Uma das maiores desvantagens do uso de linhagens permanentes é o fato da diferenciação que pode levar à perda de características funcionais importantes, como a de atividades enzimáticas. Uma maneira de se contornar o problema da diferenciação celular é o uso de culturas primárias, que embora não sejam submetidas ao controle de qualidade semelhante ao das culturas permanentes, são de fácil obtenção e manipulação e, dentro de certos limites de tempo, permitem a fácil reprodutibilidade dos experimentos.

Para que as células cresçam *in vitro*, algumas condições do cultivo devem mimetizar o que ocorre *in vivo*, por exemplo, a temperatura, oxigênio, concentração de CO₂, pH, osmolaridade e nutrientes. As maiores desvantagens dos meios de cultivos básicos não oferecem as exigências nutricionais necessárias para o crescimento e manutenção do cultivo celular, embora, muitas vezes, seja necessária a suplementação com fatores de crescimento. O cultivo sem soro apresenta diversas vantagens, mas também inúmeras desvantagens.

A adição de SFB ao meio pode aumentar a eficiência do cultivo, por exemplo, no co-cultivo com embriões *in vitro*, mas também pode introduzir componente tóxico ou patogênicos, como por exemplo, vírus. Além do soro

conter componentes desconhecidos, tais como, proteínas, ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e/ou vitaminas, a presença e concentração desses pode variar muito entre diferentes lotes, alterando o meio de cultivo e o desenvolvimento embrionário (KRISHER et al., 1999; GARDNER, 1999; GOMEZ e DIEZ, 2000; NIEMANN e WRENZYCKI, 2000; THOMPSON, J. G., 2000). Desse modo, a presença do soro no meio de cultivo pode dificultar a identificação dos fatores secretados pelas células epiteliais da tuba uterina, além da possibilidade de gerar alterações na morfologia e metabolismo do embrião, problemas no desenvolvimento pós-implantação e fetos com tamanho exagerado (EDWARDS et al., 1997; JACOBSEN et al., 2000; THOMPSON, J. G., 2000).

Esse trabalho demonstrou que a ausência de SFB no meio de cultivo não só inibe a formação da monocamada como altera a bioquímica do meio, a morfologia e morfometria.

As interações entre as células epiteliais da tuba uterina e gametas ou embriões não têm sido muito bem estudadas. Entretanto, torna-se importante a utilização de um modelo *in vitro* que mimetize as condições *in vivo*. É oportuno lembrar que células *in vitro* não são exatamente iguais às *in vivo*. Estão ausentes a organização tecidual e os mecanismos de detoxificação e excreção de substâncias, o que exige cautela na extrapolação dos resultados obtidos.

Estudos complementares tornam-se necessários para obter-se um meio totalmente definido. Talvez a suplementação do meio com suplementos específicos (albumina sérica bovina, álcool polivinil, etc) ou mesmo com

fatores que auxiliem na formação da monocamada, tais como: fibronectina, laminina e outros, possam auxiliar na obtenção de um modelo *in vitro* melhor.

CONCLUSÕES

1. As principais características morfológicas celulares mantiveram-se preservadas durante todo o experimento, na presença e ausência de SFB;
2. Morfológicamente, encontramos três tipos celulares em ambos os cultivos: células secretoras, ciladas e da monocamada, em ambos os cultivos;
3. A ausência de soro fetal bovino pode alterar o perfil bioquímico e morfológico, assim como a cinética de crescimento do cultivo das células epiteliais da tuba uterina;
4. Estudos com outros suplementos ou mesmo fatores de aderência devem ser realizados visando um modelo *in vitro* que auxilie na compreensão das interações das células da tuba uterina com os gametas e embriões.

CONCLUSÕES

1. As principais características morfológicas celulares mantiveram-se preservadas durante todo o experimento, na presença e ausência de SFB;
2. Morfologicamente, encontramos três tipos celulares em ambos os cultivos: células secretoras, ciliadas e da monocamada, em ambos os cultivos;
3. A ausência de soro fetal bovino pode alterar o perfil bioquímico e morfométrico, assim como a cinética de crescimento do cultivo das células epiteliais da tuba uterina;
4. Estudos com outros suplementos ou mesmo fatores de aderência devem ser realizados visando um modelo *in vitro* que auxilie na compreensão das interações das células da tuba uterina com os gametas e embriões.

REFERÊNCIAS

ABE, H.; OIKAWA, T. Observations by scanning microscopy of oviductal epithelial cells from cows at follicular and luteal phases. *Anatomy Record*, v. 235, p. 399-410, 1993.

AGOSTA, D.; ANUFORO, D. G.; SMITH, R. V. Cytotoxicity of acetaminophen and papaverin in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 53, p. 335-14, 1980.

AGARWAL, N.; SANYAL, S.; KRAJLER, G. K.; CHAKRAVARTI, R. N.; SUBRAHMANYAN, D. Effect of acute administration of dichloro diphenyl dichloroethane on certain enzymes of rhesus monkey. *Indian Journal of Medicine Research*, v. 68, n. 5, p. 1061-6, 1978.

AHERNE, W. A.; DUNNILL, M. S. *Morphometry*. London, Edward Arnold, 1962, p. 28-64.

AOYAGI, Y.; FUKUI, Y.; IWAZUMI, Y.; URAKAWA, M.; MINOSHIMA, Y.; ONO, H. Effect of culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology*, v. 34, n. 4, p. 749-58, 1990.

BAVISTER, B. D. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology*, v. 53, n. 2, p. 619-26, 2000.

BEARDER, H. J.; FUCHS, J. W. *The Female Reproductive System in Applied Animal Reproduction*. New Jersey: Upper Saddle River, NJ Prentice Hall, 1997, p. 6-19.

BECK, L. P.; BOOTH, L. R. The Comparative Anatomy, Histology and Morphology of the Mammalian Oviduct In: JOHNSON, A. D.; FOLEY, C. W. *The Oviduct and its Functions*. New York and London: Academic Press, 1973, p. 4-51.

BESLAY, G. A.; IDWALT, D. H.; BROOK, B. J. I. Phagocytosis and exocytosis: with the phospholipids of lysosomes, glycogen granules, vesicles and lamellar bodies. *Biological Chemistry*, v. 254, p. 32-9, 1979.

CANOGU, S.; MEYMAN, H.; METFORM, W.; MENFEO, Y. Changes beyond blast stage and during 2 after fertilizing in Polykoma embryo culture with morphological ver. cell. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 72, n. 2, p. 479-87, 1994.

CATT, J. W. Bovine embryo co-culture. *Cell Biology International*, v. 18, n. 12, p. 1155-62, 1994.

COLES, J. Método simples, clássico para dosagem da desidrogenase láctica. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA, Curitiba, Anais..., 1972, p. 145.

REFERÊNCIAS

ABE, H.; OIKAWA, T. Observations by scanning microscopy of oviductal epithelial cells from cows at follicular and luteal phases. **Anatomy Record**, v. 235, p. 399-410, 1993.

ACOSTA, D.; ANUFORO, D. C.; SMITH, R. V. Citotoxicity of acetaminophen and papaverin in primary cultures of rat hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 53, p. 306-14, 1980

AGARWAL, N.; SANYAL, S.; KHULLER, G. K.; CHAKRAVARTI, R. N.; SUBRAH-MANYAN, D. Effect of acute administration of dichloro diphenyl trichloroetane on certain enzymes of rhesus monkey. **Indian Journal of Medicine Research**, v. 68, n. 6, p. 1001-6, 1978.

AHERNE, W. A.; DUNNILL, M. S. **Morphometry**. London, Edward Arnold, 1982, p. 28-54.

AOYAGI, Y.; FUKUI, Y.; IWAZUMI, Y.; URAKAWA, M.; MINEGISHI, Y.; ONO, H. Effect of culture systems on development of *In vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. **Theriogenology**, v. 34, n. 4, p. 749-59, 1989.

BAVISTER, B. D. Interactions between embryos and the culture milieu. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 619-26, 2000.

BEARDEN, H. J.; FUQUAY, J. W. The Female Reproductive System. In: Applied Animal Reproduction. New Jersey: Upper Saddle River, NJ Prentice Hall, 1997. p. 5-12.

BECK, L. R.; BOOTS, L. R. The Comparative Anatomy, Histology and Morphology of the Mammalian Oviduct In: JOHNSON, A. D.; FOLEY, C. W. The Oviduct and its Functions. New York and London: Academic Press, 1974. p. 1-51.

BESSEY, O. A.; LOWRY, O. H.; BROCK, M. J. J. Phosphoglucumutase kiinects with the phosphates of fructose, glucose, mannose, ribose, and galactose. **Biology Chemistry**, v. 164, p. 321-9, 1946.

CAMOUS, S.; HEYMAN, H.; MEZIOU, W.; MENEZO, Y. Cleavage beyond block stage and survival after transfer of early bovine embryos culture with trophoblastic vesicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 72, n. 2, p. 479-85, 1984.

CATT, J. W. Bovine embryo co-culture. **Cell Biology International**, v. 18, n. 12, p. 1155-62, 1994.

DOLES, J. Método simples, cinético para dosagem da deidrogenase láctica. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA, Curitiba, **Anais...**, 1972, p. 145

ECTORS, F. J.; THONON, F.; DELVAL, A.; FONTES, R. S.; TOVATI, K.; BECKERS, J. F. Comparison between *in vitro* cultured of bovine embryos in conditioned medium and in presence of bovine oviductal cells versus development *in vivo* and in rabbit oviducts. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 221, 1993.

EDIRISINGHE, W. R.; WALES, R. G.; PIKE, I. L. Degradation of biochemical pools labeled with ¹⁴C glucose during culture of 8-cell and morula early blastocyst stage mouse embryos *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 72, p. 59-65, 1984.

EDWARDS, L. J.; BATT, P. A.; GANDOLFI, F.; GARDNER, D. K. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 146-54, 1997.

EL-BANNA, A. A.; HAFEZ, E. S. E. Profile analysis of the oviductal wall in rabbits and cattle. **Anatomical Record**, v. 166, p. 469-78, 1970.

ELLINGTON, J. E.; FARRELL, P. B.; CARNEY, E. W.; SIMKIN, M. E.; FOOTE, R. A. *In vitro* developmental potential of bovine zygotes in oviduct epithelial cell co-culture systems. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 223, 1990.

EYESTONE, W. H.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; NORTHEY, D. L.; GILLIGAN, B. G.; FIRST, N. L. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. **Theriogenology**, v. 28, n. 1, p. 1-7, 1987.

EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Coculture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, p. 715-20, 1989.

FALLOPIUS, 1961 *apud* BECK, L. R.; BOOTS, L. R. 1974, p. 2

FREERE-WEIBEL (1967) *apud* AHERNE e DUNNILL 1982, p.63-64

FRYDMAN, R.; LELAIDIER, C.; DE BOUARD, V.; FREITAS, S.; VOLANTE, M.; DE ZIEGLER, D.; HAZOUT, P. Coculturing- The way to blastocyst transfer? **Fertility and Sterility**, v. 60, p. 1100-1, 1993.

FUKUI, Y.; URAKAWA, M.; SASAKI, C.; CHIKAMATSO, N.; ONO, H. Development to the late morula or blastocyst stage following *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. **Animal of Reproduction Science**, v. 18, p. 139-48, 1989.

GANDOLFI, F.; MOOR, R. M. Stimulation of early embryonic development in the sheep by coculture with oviduct epithelial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 753-9, 1987.

GARDNER, D. K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 83-102, 1998.

GARDNER, D. K. Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 461-75, suppl, 1999.

GÓMEZ, E.; URÍA, H. Morphological and functional characterization of bovine oviductal epithelial cell monolayers cultured on polarizing membranes. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 37, n. 2, p. 151-62, 1997.

GOMEZ, E.; DIEZ, C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 23-37, 2000.

GONÇALVES, R. F.; FERREIRA, N.; D'ANGELO, M.; VISINTIN, J. A. Morphological study of epithelial cells from bovine uterine tube *in vitro* and *in situ*. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 16, n. 1, p.91-6, 1999.

GOTO, K.; KAJIHIRA, S.; KOSAKA, S.; KOBAYASHI, M.; NAKANISHI, Y.; OGAWA, K. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* matured follicular oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 753-8, 1988.

GOTO, K.; IWAI, N.; TAKUMA, Y.; NAKANISHI, Y. Coculture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 1449-53, 1992.

GREEN, C. E.; SEGALL, H. J.; BYARD, J. L. Metabolism, cytotoxicity and genotoxicity of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in primary cultures of rat hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 60, p. 176-85, 1981.

HAFEZ, E. S. E.; BLANDAU, R. J. **The mammalian oviduct: comparative biology and methodology**. Chicago: University of Chicago Press, 1969. 546p.

HASLER, J. F.; HENDERSON, W. B.; HURTGEN, P. J.; JIN, Z. Q.; MCCAULEY, A. D.; MOWER, S. A.; NEELY, B.; SHUEY, L. S.; STOKES, J. E.; TRIMMER, S. A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, p. 141-52, 1995.

HENRY, R. J.; SOBEL, C.; BERCKMAN, S. Interferences with biuret methods for serum protein. Use of Benedict's qualitative glucose reagent as a biuret reagent. **Anal Chemistry**, v. 29, p. 1491-5, 1957.

HEYMAN, Y.; MENEZO, Y.; CHESNE, P.; CAMOUS, S.; GARNIER, V. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using coculture with trophoblastic vesicles. **Theriogenology**, v. 27, p. 59-68, 1987.

HISHINUMA, M.; TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Isolation and monolayer culture of bovine oviduct epithelial cells. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 52, n. 6, p. 1201-8, 1989.

HUNTER, R. H. F.; FLECHON, B.; FLECHON, J. E. Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: A scanning electron microscope study. **Tissue & Cell**, v. 23, p. 641-56, 1991.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina anatomica veterinaria**. 4. ed. Zurich, 1994 (Together with nomina histological, 2. ed., 1992 and nomina embriologica veterinaria, 1992).

JACOBSEN, H.; SCHMIDT, M.; HOLM, P.; SANGILD, P. T.; VATJA, G.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Body dimensions and birth and organ weights of calves derived from *in vitro* produced embryos cultured with or without serum and oviduct epithelium cells. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1761-9, 2000.

JOSHI, M. S. Isolation, cell culture and immunocytochemical characterization of oviduct epithelial cells of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 249-61, 1988

JOSHI, M. S. Isolation, cell culture, and characterization of oviduct epithelial cells of the cow. **Microscopy Research and Technique**, v. 31, p. 507-18, 1995.

KAJIHARA, Y.; GOTO, K.; KOSAKA, S.; NAKANISHI, Y.; Y.; OGAWA, K. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts *in vitro*. **Japanese Journal of Reproduction Animal**, v. 33, p. 173-81, 1987.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 847-56, 2000.

KRISHER, R. L.; LANE, M.; BAVISTER, B. D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1345-52, 1999.

KUSAN, J. B.; WRIGHT, R. W. Blastocyst expansion, hatching and attachment of porcine embryos cocultured with bovine fibroblasts *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 5, p. 57-63, 1982.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; PARRISH, J. J.; FIRST, N. L. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 61-74, 1989.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Factors determining competence of *in vitro* produced cattle embryos. **Theriogenology**, v. 51, n. 2, p. 473-85, 1999.

LOMBARD, L.; MORGAN, B.; MCNUTT, S. The morphology of the oviduct of virgin heifers in relation to the estrous cycle. **Journal of Morphology**, v. 86, p. 1-15, 1950.

LU, K. H.; GORDON, I.; GALLAGHER, M.; McGOVERN, H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from fertilization of oocytes matured *in vitro*. **Veterinary Record**, v. 121, p. 259-60, 1987.

McATEER, J. A.; DAVIS, J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines In: DAVIS, J. M. **Basic Cell Culture**. Oxford, New York: Oxford University Press, 1994, p. 93-148.

MECHEKOUR, F.; BOUCHAHDA, A.; SCHWARTZ, J. L.; GAUROIS, B. Naissance de veaux après maturation et fécondation d'ovocytes *in vitro*, puis culture en milieux conditionnés congelés jusqu'au stade blastocyste. In: SYMPOSIUM ON ADVANCED TOPICS IN ANIMAL REPRODUCTION, Jaboticabal, Brazil, 1990, **Proceedings...** p. 153-60.

MENCK, M. C.; GUYADER-JOLY, C.; PEYNOT, N.; LE BOURHIS, D.; LOBO, R. B.; RENARD, J. P.; HEYMAN, Y. Beneficial effects of Vero cells for developing IVF bovine eggs in two different coculture systems. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 37, n. 2, p. 129-232, 1997.

MENEZO, Y.; GUERIN, J. F.; CZYBA, J. C. Improvement of human early embryo development *in vitro* by coculture on monolayers of Vero cells. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 301-6, 1990.

MENEZO, Y.; GUERIN, J. F. The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 73, p. 99-104, 1997.

MERMILLOD, P.; VANSTEENBRUGGE, A.; WILS, C.; MOURMEAUX, J. L.; MASSIP, A.; DESSY, F. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 582-7, 1993.

NANCARROW, C. D.; HILL, J. L. Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct-specific glycoproteins. **Cell Biology International**, v. 18, n. 12, p. 1105-14, 1994.

NANCARROW, C. D.; HILL, J. L. Oviduct proteins in fertilization and early embryo development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 3-13, suppl, 1995.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 21-34, 2000.

OLIVEIRA FILHO, E. B.; WATANABE, Y.; GARCIA, J. M. Obtenção de blastocistos bovinos viáveis por fecundação *in vitro* e incubação parcial *in vivo* em oviduto de coelhas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., Belo Horizonte, 1991. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991, v. 2, p. 299.

OLIVEIRA FILHO, E. B.; WATANABE, Y.; GARCIA, J. M. Establishment of an IVF program for zebu cattle (*Bos indicus*) in Brazil. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 188, 1994.

OUHIBI, N.; HAMADI, J.; GUILLAUD, J.; MENEZO, Y. Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. **Human Reproduction**, v. 5, p. 737-43, 1990.

POOL, S. H.; RORIE, R. W.; PENDLETON, R. J.; MENINO, A. R.; GOSKE, R. A. Culture of early-stage bovine embryos inside day-13 and day-14 precultured trophoblastic vesicles. **Annals of New York Academy Science**, v. 54, p. 407-13, 1988.

REISCHL, J.; PRELLE, K.; SCHOL, H.; NEUMULLER, C.; EINSPIANIER, R.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Factors affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelial cells *in vitro*. **Cell Tissue Research**, v. 296, n. 2, p. 371-383, 1999.

REXROAD J. R., C. E. Coculture of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v. 31, p. 105-14, 1989.

SCODRAS, J. M.; POLLARD, J. W.; BETTERIDGE, K. J. Effect of somatic cell type on bovine embryonic development in coculture. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 269, 1991.

SISSON, S. Aparelho urogenital do ruminante. In: GETTY, R. Anatomia dos animais domésticos. 5.ed. Editora Guanabara S.A., 1986. p.889.

THIBODEAUX, J. K.; GODKE, R. A. *In vitro* enhancement of early-stage embryos with co-culture. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 116, p. 364-72, 1992.

THOMPSON, J. G. Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, n. 3, p. 341-54, 1997.

THOMPSON, J. G.; SHERMAN, A. N. M.; ALLEN, N. W.; MCGOWAN, L.T.; TERVIT, H. R. Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, n. 2, p. 139-45, 1998.

THOMPSON, J. G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos-a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 263-75, 2000.

VAN LANGENDONCKT, A.; VANSTEENBRUGGE, A.; DESSY-DOIZÉ, C.; FLECHON, J. E.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P.; MASSIP, A.; DESSY, F. Characterization of bovine oviduct epithelial cell monolayers cultured under serum-free conditions. **In vitro Cell and Developmental Biology**, v. 31, p. 664-70, 1995.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M.; MULLAART, E.; ROOS, A. P.; MERTON, J. S.; DEN DAAS, J. H.; KEMP, B.; RUIGH, L. Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 575-97, 2000.

VILLALON, M.; ORTIZ, M. E.; AGUAYO, C.; MUNOZ, J.; CROXATTO, H. B. Differential transport of fertilized and unfertilized ova in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 26, p. 337-341, 1982.

VOELKEL, S. A.; AMBORSKI, G. F.; HILL, K. G.; GODKE, R. A. Use of a uterine-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. **Theriogenology**, v. 24, n. 3, p. 271-81, 1985.

WALTER, S.K.; HILL, J.L.; KLEEMANN, D.O.; NANCARROW, C.D. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. **Biology of Reproduction**, v.55, p.703-8, 1995.

WATANABE, Y. Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos após maturação e fecundação *in vitro* com sêmen de *Bos taurus* e *Bos indicus*. 1993. 133f. **Tese (Mestrado)** - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal.

WEETH, H. J.; HERMAN, H. A. A histological and histochemical study of the bovine oviducts, uterus and placenta. **Research Bulletin#501, University of Missouri**, 1952.

WHITAKER, J. F.; NAFTALIN, L.; SEXTON, M.; TRACEY, D. A routine procedure for estimating serum gamma-glutamyltranspeptidase activity. **Clin Chim Acta**, v. 26, n. 2, p. 293-6, 1969.

WHITE, K. L.; HEHNKE, K.; RICKORDS, L. F.; SOUTHERN, L. L.; THOMPSON, D. L.; WOODS, T. C. Early embryonic development *in vitro* by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 425-30, 1989.

YÁNIZ, J. L.; LOPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; MULLINS, K. J. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. **The Anatomical Record**, v. 260, p. 268-278, 2000.