FRANCELIUSA DELYS DE OLIVEIRA

Análise comparativa da ultraestrutura do hipoblasto em embriões bovinos
(*Bos indicus*) derivados de fertilização *in vitro*, transferência nuclear de
células somáticas e partenogênese

SÃO PAULO
2012

FRANCELIUSA DELYS DE OLIVEIRA

**Análise comparativa da ultraestrutura do hipoblasto em embriões
bovinos (*Bos indicus*) derivados de fertilização *in vitro*,
transferência nuclear de células somáticas e partenogênese**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Anatomia dos
Animais Domésticos e Silvestres da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2608
FMVZ

Oliveira, Franceliusa Delys de

Análise comparativa da ultraestrutura do hipoblasto em embriões bovinos (*Bos indicus*) derivados de fertilização *in vitro*, transferência nuclear de células somáticas e partenogênese / Franceliusa Delys de Oliveira. -- 2012.
70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto.

1. Embrião. 2. Hipoblasto. 3. Ultraestrutura. 4. Produção *in vitro*. I. Título.

ERRATA

OLIVEIRA, F. D. de **Análise comparativa da ultraestrutura do hipoblasto em embriões bovinos (*Bos indicus*) derivados de fertilização *in vitro*, transferência nuclear de células somáticas e partenogênese**. 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1º	71 f.	70 f.
Abstract	1º	71 f.	70 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

PARECER

Interessado: **Franceliusa Delys de Oliveira**

Assunto: **Protocolo de experimentação adotado em experimento animal**

A Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo analisou o projeto intitulado: "Análise comparativa da ultraestrutura do hipoblasto em embriões bovinos (*Bos indicus*) derivados de Fertilização *in vitro*, Transferência Nuclear de Células Somáticas e Partenogênese", protocolado sob o número 2655/2012, utilizando 33 (trinta e três) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, e constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de ética adotados por esta Comissão.

The "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo has analyzed the research entitled: "Comparative analysis of hypoblast ultrastructure in bovine embryos (*Bos indicus*) *in vitro* Fertilization, Somatic Cell Nuclear Transfer and Parthenogenesis derived", protocol number 2655/2012, utilizing 33 (thirty three) cattle, under the responsibility Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, and found that it was conducted in accordance with the principles of ethics adopted by the committee.

São Paulo, 21 de junho de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni

Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Franceliusa Delys de

Título: Análise comparativa da ultraestrutura do hipoblasto em embriões bovinos (*Bos indicus*) derivados de fertilização *in vitro*, transferência nuclear de células somáticas e partenogênese.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

“Cuidado com seus pensamentos, pois eles se tornam suas **palavras**

Cuidado com suas palavras, pois elas se tornam suas **ações**

Cuidado com suas ações, pois elas se tornam seus **hábitos**

Cuidado com seus hábitos, pois eles se tornam seu **caráter**

E cuidado com seu caráter, pois ele se torna seu **destino**”

Margaret Thatcher

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Maria Celi da Silva Oliveira** e **Francisco de Oliveira**

Aos meus irmãos **Mércia Cristina Oliveira de Andrade** e **Ricardo Lucas da
Silva Neto**

Aos meus cunhados **Wagner Francis Silva Sales de Andrade** e **Ana Lúcia
Pereira do Nascimento.**

Aos meus sobrinhos **Rianni Alice Nascimento da Silva** e **João Miguel
Oliveira de Andrade.**

Amo todos vocês !

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador **Antônio Chaves de Assis Neto**,

Por ter acreditado no meu potencial e colaborado ativamente na produção desse trabalho.

Por seus ensinamentos, sua atenção, dedicação e amizade que foram determinantes para o bom relacionamento durante o Mestrado.

Pelas chamadas de atenção, “corretivos”, cobranças e exigências que visavam sempre o crescimento pessoal e profissional.

Muito obrigada por tudo !

AGRADECIMENTOS

Aos “Assisetes” Paulo Ramos, Maria Angélica, Bruno Bertassoli, Maria Vitória, Daniela Moraes, Amilton Santos e Patrícia Luz. Vocês foram minha família aqui em São Paulo; me deram apoio dentro e fora da faculdade, intelectualmente e emocionalmente; fizeram os dias se tornarem mais leves e divertidos. A convivência com vocês certamente me fez uma pessoa melhor ... acima de amigos foram verdadeiros irmãos. Obrigada !

Aos amigos Cezar Zarza, Elaine Fernandes e Thais Lessa que também me ajudaram, incondicionalmente, nos momentos mais difíceis.

Aos meus professores Naianne Clebis, Carlos Eduardo Moura e aos amigos Jodonai Barbosa e Any Lima por incentivarem minha vinda para São Paulo e meu ingresso na pós-graduação.

Aos professores Maria Angélica Miglino, Vicente Borelli, Edson Liberti, Sílvia Boldrini (in memoriam), Paula de Carvalho Papa, José Roberto Kfoury, Carlos Eduardo Ambrósio, Myriam Krasilchik pelos ensinamentos valiosos durante as disciplinas da pós-graduação.

À empresa Vitrogen, em nome da Dra. Yeda Fumie Watanabe, pelo concedimento dos embriões utilizados no trabalho.

Aos professores Felipe Perecin e Flávio Meirelles e aos pós-graduandos Juliano Sangalli e José Rodrigues por também concederem parte dos embriões utilizados na dissertação.

Ao seu Gaspar pela inestimável ajuda no processamento e cortes dos embriões para a Microscopia de Transmissão.

Aos meus amigos da graduação Luciana Pinheiro, Maria do Socorro, Alana Miranda, Paulo Ricardo, Djanilson Martins, Kaline Soares, Gracinha e Janilson de Deus por todo apoio dado mesmo estando tão longe fisicamente.

Aos meus amigos do Ensino Médio Gelcineide Ribeiro, Diego Soares, Gislene Borges, Yanne Gurgel, Joelmy Sammy, Francisco Leandro, Aldair Cordeiro por toda amizade e carinho.

Aos colegas de pós-graduação Dilayla Abreu, Carlos Sarmento, Valdir Pavanello, Marcos Vinícius, Sílvia Lima, Carol Winck, Matheus Feitosa, Amanda Olivotti, Bruno Vasconcelos, Diego Carvalho, Márcio Rodrigues, Rafael Cardoso, Vanessa Oliveira, Aline Souza, Rodrigo Barreto, Aline Ambrogi pelos ótimos momentos de convivência.

Aos funcionários Rose Eli, Ronaldo Agostinho, Maria Amélia, Maicon Silva, Jaqueline Santana, Bernadete Silva, Ednaldo (Índio) pela solicitude sempre que necessário.

À CAPES pelo concedimento da bolsa durante a realização do mestrado.

RESUMO

OLIVEIRA, F. D. de **Análise comparativa da ultraestrutura do hipoblasto em embriões bovinos (*Bos indicus*) derivados de fertilização *in vitro*, transferência nuclear de células somáticas e partenogênese**. [Comparative analysis of hypoblast ultrastructure in bovine embryos (*Bos indicus*) *in vitro* Fertilization, Somatic Cell Nuclear Transfer and Parthenogenesis derived]. 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Em bovinos, o desenvolvimento embrionário é caracterizado pelo surgimento de duas camadas de células distintas, o trofotoderma e a massa celular interna. Esta última sofrerá diferenciação para formar o disco embrionário constituído pelo epiblasto e hipoblasto. Os trabalhos de caracterização morfológica do epiblasto e hipoblasto em bovinos são necessários uma vez que podem ajudar a elucidar as causas de perdas gestacionais, principalmente nos casos de embriões derivados de produção *in vitro*. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar ultraestruturalmente o embrião bovino em diferentes fases do desenvolvimento com ênfase nas células do hipoblasto. Para isso, os embriões bovinos com 7, 14 e 16 dias de gestações derivados de técnicas de produção *in vitro* foram fixados para processamento e realização de microscopia eletrônica de transmissão. De acordo com os resultados obtidos observou-se que os embriões derivados de transferência nuclear de células somáticas e de partenogênese apresentaram grandes modificações na estrutura macro e microscópica. Nestes embriões, o tamanho estava reduzido, a massa celular interna não se apresentou de forma definida. Além disso, as organelas destes embriões, responsáveis por processos de absorção, comunicação, crescimento e metabolismo celular estavam em menor quantidade e tinham modificações quanto à forma, quando comparados aos resultados vistos nos embriões derivados de fertilização *in vitro*. Assim, verificamos que os blastocistos D7 derivados de transferência nuclear e partenogênese apresentaram graves modificações morfológicas, assim como verificou-se também nas células do hipoblasto dos embriões D14 e D16.

Palavras-chave: Embrião. Hipoblasto. Ultraestrutura. Produção *in vitro*.

ABSTRACT

OLIVEIRA, F. D. de **Comparative analysis of hypoblast ultrastructure in bovine embryos (*Bos indicus*) in vitro Fertilization, Somatic Cell Nuclear Transfer and Parthenogenesis derived.** [Análise comparativa da ultraestrutura do hipoblasto em embriões bovinos (*Bos indicus*) derivados de Fertilização *in vitro*, Transferência Nuclear de Células Somáticas e Partenogênese]. 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In cattle, the embryo development is characterized by the appearance of two distinct cell layers, the trophectoderm and the inner cell mass. This latter one will suffer a differentiation to form the embryonic disc constituted by the epiblasto and hypoblast. The works on the morphological characterization of the epiblasto and hypoblast in cattle are needed because they may help to elucidate the causes of pregnancy loss, especially in cases of embryos derived from in vitro production. Considering this, the objective of this study was to characterize ultrastructurally the bovine embryo at different stages of development with emphasis on the hypoblast cells. To do so, bovine embryos at 7, 14 and 16 days of pregnancies derived from in vitro production techniques were fixed for processing and performing transmission electron microscopy. According to the results observed that embryos derived from the nuclear transfer of somatic cells and from parthenogenesis showed significant changes in the macroscopic and microscopic structure. In these embryos, the size was reduced, the inner cell mass has not show a defined shape. Furthermore, the organelles from such embryos, responsible for the absorption processes, communication, growth and cellular metabolism were fewer in number and have changes in shape, when compared to the results seen in embryos derived from in vitro fertilization. Thus, we observed that the blastocyst D7 derived from nuclear transfer and from the parthenogenesis, showed severe morphological changes, as well as for the hypoblastic cells in the D14 and D16 embryos.

Keywords: Embryo. Hypoblast. Ultrastructure. *in vitro* Production.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de embriões por idade e por técnicas empregadas.....	34
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema ilustrativo da produção de um embrião pela técnica de clonagem por transferência nuclear de célula somática.....34
- Figura 2 – Fotografia dos embriões D7 TNCS durante o processamento para MET, após a pós-fixação com tetróxido de ósmio.....36
- Figura 3 – Fotografia do blastocisto D7 FIV incluído em resina após a realização dos cortes ultrafinos.....38
- Figura 4 – Fotografia dos embriões D7 FIV. Em A, embriões na placa de cultivo antes da fixação. Em B, embrião em processo de eclosão - perda da zona pelúcida – (seta).....41
- Figura 5 - Embrião D14. Em A, saco gestacional completo. A linha preta indica a medida do diâmetro do embrião. Em B, disco embrionário (DE) formando uma protuberância no saco gestacional.....42
- Figura 6 – Fotografia do embrião D16. Em A, vista lateral da protuberância formada pelo disco embrionário. Em B, parte do saco gestacional (SG) onde se encontra o disco embrionário (DE) numa vista frontal.....43
- Figura 7 – Fotomicrografia dos cortes semifinos dos embriões D7. Em A, embrião TNCS; em B, embrião Partenogenético; em C, embrião FIV.....45
- Figura 8 - Embrião D14 (a), embrião D16 (b), corte semifino, coloração azul de toluidina. EP – epiblasto; HP – hipoblasto; TE – trofotoderma; DA – dobras amnióticas; SVP – saco vitelino primitivo.....47
- Figura 9 – Fotomicrografia eletrônica de embrião bovino D7 FIV. ZP – zona pelúcida; TE – trofotoderma; CB – cavidade blastocística; Mi – microvilosidades; MCI – massa celular interna; GC – grânulos corticais; RER – retículo

endoplasmático rugoso; N – núcleo; Nu – nucléolo; MTv - mitocôndrias com vacúolos; MTd – mitocôndrias com matriz densa; De – desmosomos; JC – junções comunicantes; setas pretas – vesículas de secreção; setas brancas – gotículas lipídicas.....50

Figura 10 – Fotomicrografia eletrônica de embrião bovino D7 TNCS. TE – trofotoderma; ZP – zona pelúcida; Nu – nucléolo; AG – aparelho de Golgi; GC – grânulos corticais; JC – junções comunicantes; asteriscos – corpos precursores nucleolares; setas pretas – vesículas de secreção; setas brancas – mitocôndrias.....52

Figura 11 – Fotomicrografia eletrônica do embrião bovino partenogênético D7. TE – trofotoderma; ZP – zona pelúcida; MV – microvilosidades; NU – nucléolo; MTa – mitocôndria alongada; MTv – mitocôndria com vacúolo; VS – vesícula de secreção; FG – fagossomo.....54

Figura 12 – Fotomicrografia eletrônica de embrião bovino D14 mostrando células do hipoblasto. N – núcleo; n – nucléolo; setas pretas – mitocôndrias; asteriscos – peroxissomos; setas pretas cheias – vesículas de secreção.....56

Figura 13 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão do disco embrionário no embrião bovino D16. Em a e b, células do epiblasto; em c e d, células do hipoblasto. N – núcleo; nu – nucléolo; de – desmosomos; mi – microvilosidades; asteriscos – mitocôndrias; setas pretas – vesículas de secreção.....57

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

TE – Trofotoderma

MCI – Massa Celular Interna

FIV – Fertilização *in vitro*

PIV – Produção *in vitro*

TNCS – Transferência Nuclear de Células Somáticas

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

FZEA-USP – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

FMVZ-USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

PBS – Phosphate Buffered Solution

UFMT – Universidade Federal do Mato Grosso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1 FORMAÇÃO DO BLASTOCISTO BOVINO.....	25
3.2 DESENVOLVIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DO ENDODERMA.....	26
3.3 SACO VITELINO.....	27
3.4 CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS.....	28
3.5 ULTRAESTRUTURA DO DISCO EMBRIONÁRIO.....	29
3.6 TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS	31
4 MATERIAIS E MÉTODO.....	33
4.1 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES.....	34
4.2 FIXAÇÃO DOS EMBRIÕES.....	35
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO – MET.....	36
5 RESULTADOS.....	39
5.1 MACROSCOPIA.....	40
5.1.1 Embriões D7 PIV.....	40
5.1.2 Embriões D14.....	42
5.1.3 Embriões D16.....	42
5.2 CORTES SEMIFINOS.....	44
5.2.1 Embriões D7 PIV.....	44
5.2.2 Embriões D14.....	46

5.2.3 Embriões D16.....	46
5.3 CORTES ULTRAFINOS.....	48
5.3.1 Embriões D7 FIV.....	48
5.3.2 Embriões D7 TNCS.....	50
5.3.3 Embriões D7 Partenogénéticos.....	53
5.3.4 Embriões D14.....	54
5.3.5 Embriões D16.....	57
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	65

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O blastocisto, desde o estágio de pré-implantação até a fase que antecede a gastrulação, sofre mudanças dramáticas em sua morfologia para a formação do organismo e para que o contato materno-fetal seja estabelecido. Tais mudanças não param neste período; ao contrário, durante toda vida embrionária o blastocisto sofre modificações ao ponto de formar um organismo com características próprias da espécie, pronto para sofrer amadurecimento e crescimento até o fim do período fetal.

Esse estágio embrionário recebe relevante atenção, pois os grupos celulares que constituem o embrião – o trofotoderma (TE) e a massa celular interna (MCI) – apresentam características importantes. O trofotoderma, camada celular que delimita externamente o blastocisto, é responsável pela formação dos anexos embrionários, ou seja, os tecidos de comunicação materno-fetal. A MCI, porção do blastocisto responsável pela formação do organismo completo, é formada basicamente por células-tronco, com capacidade de se diferenciar em qualquer tecido corporal (OESTRUP et al., 2010). Por volta do 12º dia do desenvolvimento bovino, a MCI está diferenciada em dois tipos celulares: o epiblasto, que permanece com características de células-tronco pluripotentes, participa da formação dos três folhetos embrionários; e o hipoblasto que participa da formação do endoderma e, posteriormente, do saco vitelino (VEJLSTED et al., 2005).

Embora ultimamente maior atenção seja dada as células do epiblasto, o hipoblasto também apresenta importância destacada. A partir dessas células é formado o endoderma. Este folheto embrionário participa da formação de importantes órgãos de vários sistemas, principalmente do digestório, através da sua diferenciação no intestino primitivo. Além disso, também participa da formação de dois anexos embrionários: saco vitelino e alantoide (MONTGOMERY; MULBERG; GRAND, 1999; WELLS; MELTON, 1999; TAM; KANAI-AZUMA; KANAI, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MOORE; PERSUAD, 2004). Esses dois anexos estão diretamente relacionados com a formação da placenta em bovinos.

Sabe-se que a placenta bovina é do tipo corio-alantoide. Antes da formação desta placenta definitiva foi relatada a formação de uma placenta corio-vitelina transitória (ASSIS NETO, 2005; ASSIS NETO et al., 2010). Esta placenta, derivada

diretamente do saco vitelino, apresenta indícios de funcionalidade até o 70º dia de prenhez, quando a placenta corio-alantoide se estabelece definitivamente. O período de transição entre os dois tipos de placenta coincide com o período no qual ocorrem as maiores perdas gestacionais, atribuídas a deficiências na função placentária (WOLF et al., 2003). Isto representa uma perda econômica significativa na produção de bovinos e, portanto, estudos relacionados à morfologia das estruturas componentes e precursoras da placenta são de grande valor.

A morfologia do blastocisto bovino desde os estágios iniciais só começou a ser relatada com mais detalhes a partir da década de 80 com a publicação de trabalhos relacionados à sua ultraestrutura (MASSIP et al., 1981; MOHR; TROUNSON, 1982), diferentemente de outras espécies tais como em ovinos, cuja ultraestrutura já havia sido relatada em trabalhos publicados em anos anteriores (CALARCO; McLAREN, 1976). Inicialmente esses trabalhos tinham o objetivo de descrever somente a estrutura dos embriões; subsequentemente, os trabalhos seguiram um padrão comparativo, com análises morfológicas entre embriões produzidos por técnicas *in vitro* diferentes (TALBOT et al., 2000).

Já foi relatado que embriões produzidos pela técnica de fertilização *in vitro* (FIV), podem vir a termo e originar indivíduos normais. Porém, casos de malformações desde os estágios mais iniciais da prenhez também já foram evidenciados (MOHR; TROUNSON, 1982). Isso acontece principalmente em embriões derivados de técnicas de produção *in vitro* (PIV), clonados por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) e embriões partenogênicos. As alterações apresentadas por esses embriões são de ordem morfológica e também cromossômica, o que leva a uma expressão gênica anormal. Acredita-se que essas, juntamente com disfunções placentárias, são as principais causas relacionadas à perda embrionária nesse período, tão frequente entre esses tipos de embriões (HILL et al., 2000; TALBOT et al., 2000; MADDOX-HYTTEL et al., 2003; FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006).

Sabendo-se que o hipoblasto é a estrutura embrionária a qual origina o saco vitelino e este, por sua vez, é um anexo embrionário de importância relevante para a manutenção da gestação já que participa da formação de uma placenta transitória a qual mantém o desenvolvimento do embrião até que a placenta corio-alantoide definitiva se forme, estudos relacionados à formação de tais estruturas são importantes e se fazem necessários. Sabe-se também que em embriões que não

são provenientes de monta natural ocorre uma taxa de perda na gestação muito alta no período de transição da placenta corio-vitelina para a placenta corio-alantoide, sugerindo que as alterações presentes neste anexo embrionário podem ser a causa para essa alta taxa de perdas embrionárias. Tal informação reforça a importância desses estudos em grupos de embriões provenientes de diferentes técnicas. Sendo assim, o estudo da estrutura do hipoblasto pode nos fornecer meios de identificar as alterações morfológicas sofridas nos embriões FIV, TNCS e partenogenéticos visando em estudos posteriores, modificar tais alterações. Isso pode representar uma diminuição nas perdas gestacionais bovinas, o que significa um ganho econômico na produção de gado bovino.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Partindo da hipótese de que há modificações estruturais no embrião, especificamente no hipoblasto, derivados de FIV, clonagem e partenogênese quando comparados a embriões de monta natural, os objetivos deste trabalho foram traçados.

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo é caracterizar ultraestruturalmente as especializações de origem hipoblástica do embrião bovino em diferentes fases do desenvolvimento embrionário.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar a ultraestrutura de embriões bovinos em diferentes estágios de desenvolvimento, D7, D14 e D16, com ênfase nas células do hipoblasto, identificando as principais mudanças na morfologia das células.

Comparar a estrutura dos embriões bovinos provenientes de diferentes técnicas de produção *in vitro*, apontando as principais diferenças morfológicas dentre os três grupos estudados.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura está estruturada em seis tópicos: 3.1 Formação do blastocisto bovino; 3.2 Desenvolvimento e diferenciação do endoderma; 3.3 Saco vitelino; 3.4 Células-tronco embrionárias; 3.5 Ultraestrutura do disco embrionário; 3.6 Transferência nuclear de células somáticas.

3.1 FORMAÇÃO DO BLASTOCISTO BOVINO

Após a fertilização, a célula resultante - o zigoto - passa por um processo chamado clivagem no qual é formada a mórula. O próximo passo na diferenciação inicial do embrião é o estabelecimento da blástula ou blastocisto. Em bovinos, bem como nos demais mamíferos, o desenvolvimento embrionário do blastocisto é caracterizado pelo surgimento de duas camadas de células distintas (RED-HORSE et al., 2004; OZAWA; HANSEN, 2011). O trofotoderma (TE) delimita todo blastocisto externamente e é responsável pela formação da porção fetal da placenta, e a massa celular interna (MCI) que posteriormente sofrerá diferenciação em outras duas camadas, o epiblasto e o hipoblasto. Portanto, após a implantação, o blastocisto é constituído por três tipos celulares, o trofotoderma, o epiblasto e o hipoblasto (ROSSANT; TAM, 2009). O epiblasto é constituído de células pluripotentes derivadas, tipicamente, da MCI dos blastocistos, com capacidade de propagação indefinida e de formar todos os folhetos embrionários de um embrião, incluindo a linhagem germinativa (FILLIERS et al., 2011). Estas modificações ocorrem no início da primeira semana após a fecundação, por volta do oitavo dia (BALL; PETERS, 2006). No décimo dia de desenvolvimento, uma camada de hipoblasto começa a ser formada, estabelecendo o disco embrionário no décimo segundo dia, quando também fica constituído o epiblasto (MADDOX-HYTTEL et al., 2003). Vejlsted et al. (2005) cita que nesse dia os blastocistos já sofreram alongamento e tem início o processo de gastrulação. Sabe-se que a diferenciação destas células é de ordem genética, mediada pela expressão de alguns genes específicos e também, posicionais, de acordo com a localização dos blastômeros na

mórula. Por exemplo, na diferenciação do trofotoderma ocorre a expressão do fator de transcrição Cdx2, enquanto que na massa celular interna os marcadores característicos de pluripotência tais como Oct4, Nanog e Sox2 são expressos (RED-HORSE et al., 2004; ROSSANT; TAM, 2009).

3.2 DESENVOLVIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DO ENDODERMA

O hipoblasto é responsável pela formação do endoderma que reveste o saco vitelino primitivo e parte do mesoderma extraembrionário. O aparecimento da linha primitiva, o desenvolvimento da notocorda e a diferenciação dos três folhetos germinativos são eventos que ocorrem a partir do disco embrionário bilaminar e caracteriza-se por um rápido crescimento do embrião (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MOORE; PERSUAD, 2004). Nos mamíferos, durante a gastrulação, ocorre a formação dos três folhetos embrionários: ectoderma, endoderma e mesoderma (MONTGOMERY; MULBERG; GRAND, 1999; WELLS; MELTON, 1999). Para a diferenciação do endoderma (que é derivado, predominantemente do hipoblasto, mas também tem participação de células do epiblasto) e do mesoderma é necessário a presença do TGF beta, um fator de crescimento envolvido na especificação desses folhetos (SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011). As células precursoras do endoderma ficam localizadas na região posterior do epiblasto junto à linha primitiva. Depois elas sofrem internalização quando migram e se justapõem às células hipoblásticas, dando origem ao endoderma (TAM; KANAI-AZUMA; KANAI, 2003). Neste processo de diferenciação a expressão de outros fatores apresenta relevância tais como Ativina, Nodal, Sox17, Mixl-1, HNFs e Foxa2 (KUBO et al., 2003; KWEK et al., 2009). Estudos realizados por Kubo et al. (2003) mostraram que destes, a ativina, em grandes concentrações, desempenha papel importante na diferenciação do endoderma e na indução da expressão de outros fatores. Outros estudos realizados em embriões de galinha demonstraram que o estabelecimento das três camadas germinativas ocorre a partir da ação de sinais indutivos e repressores que regulam a expressão gênica nos tecidos em formação, e esse processo é definido ainda no período de formação da linha primitiva (CHAPMAN et al., 2007).

Morfologicamente, as células endodérmicas possuem muitas microvilosidades e vesículas de fagocitose e pinocitose, as quais são estruturas típicas de células com funções de absorção e digestão de nutrientes (neste caso, maternos) bem desenvolvidas (BIELINSKA; NARITA; WILSON, 1999).

O endoderma participa principalmente da formação do trato gastrointestinal, mas também do aparelho respiratório, das cavidades do ouvido e parte do sistema imunológico, tireoide e paratireoide (WELLS; MELTON, 1999; GRAPIN-BOTTON; MELTON, 2000; SHIVDASANI, 2002). Em mamíferos, o intestino primitivo se forma a partir de duas dobras no endoderma do saco vitelino, uma anterior e outra posterior. Sendo assim, as células localizadas anteriormente e posteriormente no embrião formam a região ventral do tubo intestinal. As células da região lateral também sofrem um dobramento de forma que parte do saco vitelino é incorporada ao embrião e origina o intestino primitivo juntamente com o mesoderma lateral (GRAPIN-BOTTON; MELTON, 2000; SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011). Em camundongos, a região do endoderma que origina o intestino primitivo é chamada de endoderma definitivo, enquanto que o endoderma da parede do saco vitelino é chamado de endoderma visceral (CERVANTES; YAMAGUCHI; HEBROK, 2009). Inicialmente, o intestino primitivo é subdividido em intestino anterior, intestino médio e intestino posterior, sendo o intestino anterior localizado cranialmente, o intestino posterior localizado caudalmente e o intestino médio, contínuo com o saco vitelino, localizado entre os dois primeiros (KLUTH; AESCHKE-MELLI; FIEGEL, 2003; McGEARDY et al., 2006). Essa diferenciação ocorre semelhantemente na maioria dos vertebrados sendo que os principais experimentos são feitos em aves e ratos e camundongos.

3.3 SACO VITELINO

O hipoblasto, por sua vez, prolifera formando uma camada que forra a blastocela, a qual passa a ser denominada saco vitelino (BEIGUELMAN, 2000). Essa estrutura, juntamente com o trofotoderma, constitui uma espécie de placenta primitiva responsável pela nutrição inicial do embrião. Somente quando o alantoide

se desenvolve e se associa com o cório é que o primórdio da placenta corio-alantoide se estabelece e passa a desempenhar o papel de nutrição do embrião (BIELINSKA; NARITA; WILSON, 1999).

O saco vitelino bovino (*B. indicus*) persiste até 70 dias de gestação, e o seu epitélio apresenta indícios de atividade funcional até 50 dias de gestação, fatos indicativos da existência de uma placenta vitelina ativa, importante para a manutenção da gestação, que se estabelece temporariamente entre a placenta corio-vitelina transitória e a placenta corio-alantoide definitiva na espécie (ASSIS NETO, 2005; ASSIS NETO et al., 2010). A ontogênese e filogênese vitelinas analisadas frente as suas inúmeras funções (síntese, transporte, acúmulo de proteínas e de fluídos, fagocitose, síntese e metabolismo de esteroides, eritropoiese, hematopoiese, transporte de ferro, etc.) podem ser indicativos como elementos sinalizadores dos altos índices de perdas gestacionais em várias espécies. De outra parte, a diferenciação celular vitelina, alicerça-se na ideia de que todos os derivados endodérmicos ou presentes na relação endoderma-mesoderma podem sugerir importantes pistas para avanços nesta área do conhecimento (JOHANSSON; WILES, 1995).

3.4 CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

Atualmente, uma grande atenção vem sendo dada a este período do desenvolvimento porque as células-tronco embrionárias derivam, normalmente, da massa celular interna ou, posteriormente, do epiblasto no caso dos blastocistos (OESTRUP et al., 2010). Os embriões mais utilizados como fonte de células-tronco são blastocistos no 12º dia após a fertilização já que apresentam um epiblasto que fornece um número maior de células pluripotentes. Poucos trabalhos feitos abordam a capacidade de pluripotência do epiblasto e do hipoblasto e, portanto, estudos com este objetivo são necessários.

A obtenção de culturas de células derivadas do trofotoderma e da massa célula interna isoladamente é importante para estudos sobre a expressão gênica e o funcionamento celular, bem como para a aquisição de linhagens de células-tronco (OZAWA; HANSEN, 2011). Pesquisas para conhecer os mecanismos de

pluripotencialidade das células da massa celular interna vêm sendo desenvolvidas em bovinos e em outros animais, como em suínos (HALL et al., 2009). Porém, os resultados obtidos até hoje ainda não são suficientes para esclarecer essa capacidade de pluripotência.

É provável que linhagens de células-troncos embrionárias verdadeiras e estáveis de suínos e bovinos sejam reconhecidas dentro dos próximos anos. Entretanto, para se alcançar este objetivo são necessárias mais pesquisas sistemáticas direcionadas para a sua caracterização morfológica e cultivo. Além disso, linhagens de células-tronco de bovinos podem abrir novos caminhos para a produção de animais geneticamente modificados, uma vez que células-tronco têm capacidade indefinida de auto-renovação e podem ser mais propensas à recombinação homóloga. Finalmente, linhagens de células-tronco estabelecidas a partir de blastocistos geneticamente modificados para conter genes de doenças humanas, podem ser diferenciadas com certas populações celulares que podem permitir estudos dos mecanismos das doenças a nível celular, em paralelo com estudos em modelos animais nascidos da transferência de embriões semelhantes geneticamente modificados (MADDOX-HYTTEL; SVARCOVA; LAURINCIK, 2007).

Recentemente, algumas pesquisas que envolvem o cultivo de células-tronco derivadas do endoderma do saco vitelino foram desenvolvidas com sucesso. Tanto para blastocistos bovinos partenogenéticos (TALBOT et al., 2005) quanto para blastocistos suínos *in vivo* (TALBOT et al., 2007) foi possível estabelecer uma cultura celular derivada do endoderma, após o isolamento destas células, com relativa facilidade. Nestes trabalhos, foram feitas análises da morfologia celular, da expressão gênica, da produção de proteínas e da atividade metabólica das células em cultura e verificou-se uma atividade celular normal para os blastocistos suínos e algumas poucas alterações para os blastocistos bovinos. Esses resultados são relevantes, pois permitem estudos comparativos entre blastocistos *in vivo*, *in vitro* e clonados, bem como um estudo mais detalhado sobre expressão gênica e o desenvolvimento embrionário nessas espécies.

3.5 ULTRAESTRUTURA DO DISCO EMBRIONÁRIO

A morfologia do embrião bovino vem sendo alvo de estudos devido sua importância como animal doméstico e de produção. A avaliação da morfologia embrionária apresenta importância relevante para inferir a qualidade do embrião quanto a sua normalidade no desenvolvimento em procedimentos de transferência embrionária e, também, estabelecer melhoria da cultura *in vitro* de células derivadas dos embriões (TALBOT et al., 2000; VEJLSTED et al., 2005). Antigamente, os métodos utilizados para avaliação da morfologia do embrião eram a cor, forma, tamanho e compactação das células, tamanho do espaço perivitelino como descrito por Lindner e Wright Jr. (1983). Neste estudo, os autores concluíram que a fase na qual o embrião é implantado na receptora não influencia no sucesso da prenhez, diferentemente da qualidade do embrião utilizado. Como previsto, os embriões de baixa qualidade apresentaram uma taxa de sucesso de prenhez menor que os embriões de boa ou ótima qualidade.

Com o passar do tempo, o aperfeiçoamento de técnicas mais confiáveis de avaliação morfológica permitiram uma melhoria nos estudos dessa área. Atualmente, a microscopia eletrônica de transmissão e varredura, bem como técnicas de microscopia de luz e imunohistoquímica são os mais utilizados para esse tipo de estudo.

Muitos trabalhos desde então realizaram análises descritivas e comparativas dos embriões bovinos e de outras espécies. Massip et al. (1981) relata a morfologia de blastocistos iniciais dando enfoque nas estruturas de comunicação celular e na comparação com outras espécies de mamíferos. Bem antes, a ultraestrutura do embrião ovino foi estudada por Calarco e McLaren (1976) e essa espécie vem sendo muito utilizada para fins comparativos com os bovinos (TALBOT et al., 2000).

Bielinska; Narita; Wilson (1999) relatam que embriões partenogênicos apresentam alterações morfológicas graves causadas pela falta de desenvolvimento adequado do endoderma e consequentemente ausência de ações indutivas desse tecido. O próprio endoderma, por exemplo, apresenta-se de maneira não uniforme, com células colunares e escamosas ao mesmo tempo. A linha primitiva, no epiblasto, não se forma corretamente e a migração de células a partir dela ocorre desorganizadamente. Como não existe nesses casos uma padronização corporal correta, presume-se que a expressão gênica nesses embriões esteja da mesma forma prejudicada.

3.6 TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS

A técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS) consiste na formação de um novo indivíduo a partir da união de um núcleo proveniente de uma célula somática do animal a ser clonado, com um ovócito enucleado de uma doadora (Figura 1). Há relatos desde 1938 da técnica, mas somente em 1952 foi realizada com sucesso em anfíbios. Desde então, vários animais foram clonados pela técnica de TNCS tais como camundongos, suínos, gatos, coelhos, ovelhas e bovinos. Após essa união de estruturas celulares de diferentes fontes é necessário ocorrer uma reprogramação nuclear já que o material da célula somática terá que apresentar um desenvolvimento embrionário. A falta de conhecimento sobre erros e modificações que acontecem nesta fase reflete na baixa taxa de sobrevivência dos conceitos derivados desta técnica. Somente cerca de 50% dos embriões chegam a 21 dias de desenvolvimento com características próprias da idade (EDWARDS et al., 2003).

Os embriões produzidos *in vitro* apresentam um baixo índice de blastocisto, dificuldade para a criopreservação e o custo de produção é maior que do embrião produzido por transferência embrionária. Além disso, nesse tipo de prenhez os bezerros nascem com peso acima da média, com muitas anomalias congênitas, o período de gestação é maior além do grande número de casos de aborto. É uma técnica que pode ser utilizada em larga escala desde que mais estudos sejam realizados a fim de melhorar os índices zootécnicos e diminuir os custos. A vantagem da técnica de transferência é a oportunidade de utilizar somente animais de boa qualidade genética, o que representa um aumento na produção destes animais. A transferência nuclear é utilizada para regeneração de raças, de espécies em extinção ou até extintas, melhoramento genético com a produção de animais com as características desejadas, ou seja, a produção de clones transgênicos para aplicação de melhoramentos nas características produtivas e aplicações biomédicas (EDWARDS et al., 2003; RUMPF, 2007).

Figura 1 – Esquema ilustrativo da produção de um embrião pela técnica de clonagem por transferência nuclear de célula somática

CLONAGEM POR TRANFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Fonte: (OLIVEIRA, F. D, 2012).

Materiais e Método

4 MATERIAIS E MÉTODO

Os procedimentos e técnicas aplicados na elaboração deste estudo estão descritos nos materiais e método. Esta seção foi subdividida em três tópicos: 4.1 Obtenção dos embriões; 4.2 Fixação dos embriões; 4.3 Microscopia eletrônica de transmissão.

4.1 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES

Foram utilizados embriões bovinos (*B. indicus*) produzidos por FIV nos seguintes períodos gestacionais: Dias 07 (D7), Dias 14 (D14) e Dias 16 (D16). Além disso, foram utilizados também embriões D7 derivados de TNCS e Partenogênese, totalizando um número de 33 embriões. Os dados referentes ao número de embriões utilizados por idade e por técnica estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1 – Quantidade de embriões por idade e por técnicas empregadas

Idade/Técnica	FIV	TNCS	Partenogênese
D7	7	7	7
D14	6	-	-
D16	6	-	-

O processo de produção *in vitro* foi realizado no laboratório da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP – Pirassununga/SP. Todo o material doado foi acondicionado em caixas apropriadas e posteriormente transportado para análises no Laboratório de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP – São Paulo/SP. Portanto, para os

embriões D7, a coleta foi realizada diretamente no laboratório onde estavam em cultivo.

Os embriões D7 derivados de FIV foram produzidos nos laboratórios da Vitrogen, Cravinhos-SP, e os derivados de TNCS e partenogênicos foram produzidos na FZEA-USP. Em todos os casos, os embriões se encontravam em meio de cultivo e foram postos diretamente no glutaraldeído 2,5% para a fixação.

Já para os embriões D14 e D16, após a fecundação foi realizada transferência de embriões no dia 7 às novilhas receptoras previamente sincronizadas. No quinto e sétimo dias, depois das transferências, os úteros foram coletados e foram lavados para a coleta dos embriões nos dias 14 e 16, respectivamente. Em seguida, os lavados foram colocados em solução de PBS. Com o auxílio de estereomicroscópio foram feitas a avaliação e identificação dos mesmos, assim como as preparações para os procedimentos de fixação.

Na primeira coleta desses embriões, realizada no abatedouro da FZEA-USP, Campus de Pirassununga, foram obtidos seis embriões no décimo quarto dia de gestação a partir de três úteros de vacas doadoras. Para a coleta dos embriões foram realizadas lavagens uterinas com solução de PBS, uma vez que embriões nesta idade ainda não estão implantados. Posteriormente, os embriões foram fixados em soluções de glutaraldeído 2,5% para o posterior processamento de microscopia eletrônica.

A segunda coleta foi realizada no Campus da UFMT na qual também foram obtidos seis embriões no décimo sexto dia de gestação, porém a partir de onze vacas doadoras e o procedimento realizado foi o mesmo para os embriões de 14 dias.

4.2 FIXAÇÃO DOS EMBRIÕES

Os embriões coletados foram fixados em glutaraldeído a 2,5% por um período de 48 horas, com temperatura de 4°C. Nos embriões D14 e D16, o saco gestacional foi fixado completamente, porém para a continuidade do processamento, a região na qual se encontrava o disco embrionário foi dissecada. Já nos embriões D7, o processamento foi realizado com o embrião inteiro, já que não havia necessidade de

dissecação. Todo o processamento desde a fase de fixação foi feito com o auxílio de um estereomicroscópio Leica S6E para uma melhor visualização dos embriões.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO – MET

Após a fixação os embriões foram lavados em PBS. Em seguida, foi realizada a etapa de pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em solução tampão fosfato de sódio por 2 horas a temperatura ambiente (Figura 2). Após nova lavagem em PBS, os embriões foram contrastados com acetato de uranila, no qual permaneceram *overnight*. Em seguida, os embriões foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico a 50%, 70%, 90% e 100% e, posteriormente, lavados em óxido de propileno.

Figura 2 – Fotografia dos embriões D7 TNCS durante o processamento para MET, após a pós-fixação com tetróxido de ósmio

Por um tempo de 4 horas, as amostras de embriões permaneceram, sob rotação, numa mistura de óxido de propileno e resina Spurr na proporção de 1:1. Na sequência, essa mistura foi substituída por resina pura, na qual permaneceu *overnight*. Após este período, os embriões foram incluídos em uma nova resina pura em moldes e permaneceram na estufa a 70° por um período de 72 horas para consolidar a polimerização da resina (Figura 3).

Com a finalidade de localizar e caracterizar as áreas de interesse, os blocos foram cortados seriadamente em um ultramicrotomo. Cortes semifinos de 400 nm de espessura foram retirados e corados com azul de Toluidina para observação ao microscópio de luz.

Os cortes ultrafinos foram feitos num ultra micrótomo Leica ULTRACUT UCT®, com de cerca de 70 nm de espessura. Os materiais foram colhidos em telas de cobre e contrastados pelo acetato de uranila 2% em água destilada por 5 minutos e pelo citrato de chumbo 0,5% em água destilada durante 10 minutos.

Os cortes semifinos foram observados e fotografados num microscópio Olympus DP71 e os ultrafinos foram analisados num microscópio Morgagni 268D.

Figura 3 – Fotografia do blastocisto D7 FIV incluído em resina após a realização dos cortes ultrafinos

Resultados

5 RESULTADOS

De acordo com as técnicas aplicadas, a morfologia dos embriões foi descrita quanto ao aspecto macroscópico com a observação do embrião inteiro com 7 dias e do disco embrionário e do saco gestacional no caso dos embriões D14 e D16. As análises microscópicas foram realizadas a partir dos cortes semifinos e ultrafinos de todos os embriões. Assim os resultados foram subdivididos em três tópicos: 5.1 Macroscopia; 5.2 Cortes Semifinos; 5.3 Cortes Ultrafinos.

5.1 MACROSCOPIA

A análise macroscópica foi realizada com todos os embriões das diferentes idades. Os embriões D7 FIV, TNCS e partenogenéticos foram fotografados ainda na placa de cultivo e como apresentaram morfologia semelhante foram descritos no mesmo tópico. Já os embriões D14 e D16 foram fotografados e analisados após a coleta nos úteros das vacas doadoras.

5.1.1 Embriões D7 PIV

Aos 7 dias de desenvolvimento os embriões FIV, TNCS e partenogenéticos apresentaram forma esférica com a cavidade blastocística bem expandida sendo delimitada por uma camada única de trofotoderma. Internamente, a massa celular interna apresentava-se bem distinta localizada num dos polos embrionários (Figura 4A). Nesse estágio não foi possível visualizar se o hipoblasto já havia começado o seu desenvolvimento. Alguns embriões ainda se apresentavam envolvidos pela zona pelúcida e outros estavam em processo de eclosão ou já totalmente livres da camada glicoproteica (Figura 4B). Os embriões que ainda apresentavam zona pelúcida eram notavelmente menores que os embriões eclodidos.

Figura 4 – Fotografia dos embriões D7 FIV. Em A, embriões na placa de cultivo antes da fixação. Em B, embrião em processo de eclosão - perda da zona pelúcida – (seta)

5.1.2 Embriões D14

Nos embriões de 14 dias o disco embrionário foi facilmente identificado em todos eles dentro do saco gestacional. Ele se apresentou como uma protuberância que era contínua com as membranas extraembrionárias (Figura 5B). O diâmetro dos embriões coletados variou entre 4mm e 11mm com uma média de 6,8mm, considerando-se o tamanho do saco gestacional (Figura 5A). Com isso, foi possível diferenciar o processo de alongamento do blastocisto bovino que passa de uma estrutura ovoide a uma estrutura tubular.

Figura 5 - Embrião D14. Em A, saco gestacional completo. A linha preta indica a medida do diâmetro do embrião. Em B, disco embrionário (DE) formando uma protuberância no saco gestacional

5.1.3 Embriões D16

Da mesma forma que no embrião D14, nos embriões de 16 dias, o disco embrionário também foi claramente identificado em todas as amostras (Figura 6A). Estes por sua vez, apresentavam um saco gestacional muito mais alongado, entre o qual se encontrava o disco embrionário (Figura 6B).

Figura 6 – Fotografia do embrião D16. Em A, vista lateral da protuberância formada pelo disco embrionário. Em B, parte do saco gestacional (SG) onde se encontra o disco embrionário (DE) numa vista frontal.

5.2 CORTES SEMIFINOS

Assim como nas análises macroscópicas, os dados referentes aos embriões D7 FIV, TNCS e partenogenéticos foram agrupados em um único tópico. Aqui a microscopia dos embriões foi descrita com base nos cortes semifinos corados por azul de toluidina.

5.2.1 Embriões D7 PIV

De modo geral os embriões derivados de produção *in vitro* estavam na fase de blastocisto inicial caracterizada por uma forma esférica e pela presença do trofotoderma delimitando a cavidade blastocística já bem formada assim como, a massa celular interna. Os embriões TNCS (Figura 7A) e partenogenéticos (Figura 7B), apesar de serem da mesma idade que os embriões FIV (Figura 7C), apresentaram um leve retardo no desenvolvimento, o qual pode ser observado pelo tamanho da blastocela. Outro indicativo é a presença da zona pelúcida ainda espessa recobrando todo embrião. Nos embriões FIV é possível visualizar a zona pelúcida, porém esta se encontra numa forma bem delgada, mostrando que ela diminui de tamanho à medida que a blastocela se expande.

Nestes blastocistos, as células do trofotoderma estavam bem estratificadas delimitando a cavidade blastocística e as células da massa celular interna apresentaram concentradas em um dos polos embrionários, demonstrando nitidamente um estado de desenvolvimento maior que os demais blastocistos. Já nos embriões TNCS e partenogenéticos, a MCI apresentou-se de forma difusa, espalhada ao longo da blastocela. Em nenhum dos embriões desta idade foi encontrado indícios de diferenciação das células da massa celular interna em epiblasto e hipoblasto.

Figura 7 – Fotomicrografia dos cortes semifinos dos embriões D7. Em A, embrião TNCS; em B, embrião partenogenético; em C, embrião FIV.

5.2.2 Embriões D14

No embrião D14 as camadas do disco embrionário, epiblasto e hipoblasto, estão totalmente estabelecidas e facilmente distintas. O epiblasto forma um epitélio contínuo com o trofotoderma, ambos em contato com o hipoblasto que forma uma única camada junto a eles. É possível visualizar o início da formação das dobras amnióticas formadas apenas pelo trofotoderma, sem a participação do hipoblasto, que darão origem ao âmnio. O hipoblasto apresenta células com formato cuboide em ambas porções – tanto em contato com o epiblasto, quanto com o trofotoderma (Figura 8A). Em alguns pontos do disco bilaminar encontra-se uma lâmina basal entre o epiblasto e o hipoblasto. Nesta idade já não foi encontrada a camada de Rauber.

5.2.3 Embriões D16

Nos embriões D16, da mesma forma que na fase anterior, o epiblasto é contínuo com o trofotoderma. O hipoblasto apresenta uma morfologia distinta de acordo com sua localização – o hipoblasto do disco embrionário exibe células com formato cuboide com núcleos redondos facilmente distintos, enquanto que o hipoblasto que reveste a parede do saco vitelino primitivo apresenta-se como em epitélio de células estratificadas. As dobras amnióticas estão presentes mais nitidamente que nos embriões D14, mas ainda não formaram a cavidade amniótica, deixando o disco embrionário em contato com a cavidade uterina. Nestes embriões ainda não há indícios de formação da linha primitiva que presuntivamente ocorre por volta do décimo quinto dia (Figura 8B).

Figura 8 - Embrião D14 (A), embrião D16 (B), corte semifino, coloração azul de toluidina. EP – epiblasto; HP – hipoblasto; TE – trofotoderma; DA – dobras amnióticas; SVP – saco vitelino primitivo.

5.3 CORTES ULTRAFINOS

Os cortes ultrafinos dos embriões foram feitos em sequencia aos cortes semifinos. Todos os embriões passaram por esse processamento para a visualização e descrição das organelas celulares e suas prováveis modificações. Assim a descrição foi subdividida em 5 tópicos: 5.3.1 Embriões D7 FIV; 5.3.2 Embriões D7 TNCS; 5.3.3 Embriões D7 Partenogenéticos; 5.3.4 Embriões D14; 5.3.5 Embriões D16.

5.3.1 Embriões D7 FIV

Em relação às especializações da membrana celular os embriões FIV apresentaram as principais. Algumas microvilosidades foram encontradas nas células trofectodérmicas na superfície em contato com a zona pelúcida (Figura 9A). Da mesma forma, também foi verificada a presença desta especialização nas células da MCI, na superfície em contato com o trofectoderma, neste caso em maior quantidade (Figura 9D). Entre as células do trofectoderma, bem como entre as células da MCI foi observada a presença de junções comunicantes, na superfície lateral destas células. Além das junções, estavam presentes também desmossomos, porém estes estabeleciam contato entre as células da MCI e do trofectoderma (Figura 9E).

Dentre as especializações citoplasmáticas foi possível observar a presença de gotículas lipídicas nos dois tipos celulares, porém em maior quantidade nas células do trofectoderma (Figura 9D). Também foram abundantes vesículas de secreção de vários tamanhos distribuídas por todo citoplasma (Figura 9B). Uma formação semelhante a um grânulo cortical foi identificada no citoplasma próximo a membrana nuclear (Figura 9C). Fagossomos ou lisossomos não foram vistos nestes embriões. As mitocôndrias foram numerosas e eram polimórficas, apresentando desde um formato ovoide até um formato mais alongado. A maior parte destas organelas apresentou uma morfologia normal, porém em algumas mitocôndrias das células da MCI observou-se a formação de vacúolos internos e a presença de uma

matriz muito densa, características de uma mitocôndria imatura (Figura 9D e E). Alguns poucos filamentos intermediários foram encontrados próximos aos desmosomos. Retículo endoplasmático rugoso (RER) foi encontrado em pequena quantidade nas células da MCI, localizado próximo ao núcleo (Figura 9C).

O núcleo das células destes embriões mostrou comatina descondensada e presença de grandes nucléolos, normalmente dois, tanto nas células trofodérmicas quanto nas células da MCI (Figura 9C).

Figura 9 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão de embrião bovino D7 FIV. ZP – zona pelúcida; TE – trofodermis; CB – cavidade blastocística; Mi – microvilosidades; MCI – massa celular interna; GC – grânulos corticais; RER – retículo endoplasmático rugoso; N – núcleo; Nu – nucléolo; MTv - mitocôndrias com vacúolos; MTd – mitocôndrias com matriz densa; De – desmosomos; JC – junções comunicantes; setas pretas – vesículas de secreção; setas brancas – gotículas lipídicas.

5.3.2 Embriões D7 TNCS

Nestes embriões verificou-se a presença de microvilosidades, principalmente nas células do trofotoderma, na superfície em contato com a zona pelúcida (Figura 10C). A principal forma de comunicação celular se deu pela presença de junções

comunicantes entre as células da MCI e do trofectoderma (Figura 10E). Nestas células não foram observados desmossomos, diferentemente dos embriões FIV.

No citoplasma dos embriões TNCS, diferentemente dos achados nos embriões FIV, não foram observadas gotículas lipídicas, porém vesículas de secreção estavam presentes e, notavelmente em maior quantidade (Figura 10B). Grânulos corticais também foram identificados nestes embriões próximos a membrana plasmática das células da MCI (Figura 10E). As mitocôndrias tinham forma irregular nas células do trofectoderma e eram ovoides nas células da MCI. Em ambos os casos, a matriz era pouco densa e as cristas bem visíveis (Figura 10C). Formações semelhantes ao aparelho de Golgi foram encontradas nas células do trofectoderma (Figura 10D) e o retículo endoplasmático não foi identificado, diferentemente dos embriões FIV.

Nestes embriões o núcleo das células era grande, porém somente um nucléolo foi observado, diferentemente dos embriões FIV. Além disso, verificou-se a presença de corpos precursores nucleolares no núcleo das células trofectodérmicas (Figura 10A).

Figura 10 – Fotomicrografia eletrônica de embrião bovino D7 TNCS. TE – trofectoderma; ZP – zona pelúcida; Nu – nucléolo; AG – aparelho de Golgi; GC – grânulos corticais; JC – junções comunicantes; asteriscos – corpos precursores nucleolares; setas pretas – vesículas de secreção; setas brancas – mitocôndrias.

5.3.3 Embriões D7 Partenogenéticos

As especializações da membrana plasmática vistas nos embriões partenogenéticos foram as mesmas observadas nos embriões TNCS. Extensas áreas de microvilosidades nas células trofotodérmicas estavam presentes, mais uma vez, na superfície em contato com a zona pelúcida. Entre as células observou-se a presença de junções comunicantes e nenhum desmossomo foi encontrado.

O citoplasma dos embriões partenogenéticos apresentou as maiores alterações. As gotículas lipídicas e vesículas de secreção tão abundantes nos demais tipos de embriões não estavam presentes em nenhum tipo celular. Também não foram identificados grânulos corticais nem organelas como retículo endoplasmático ou aparelho de Golgi. As mitocôndrias apresentaram grandes alterações: observaram-se mitocôndrias que apresentavam formato ovoide, alongado, até as de forma irregular. Internamente, as cristas mitocôndrias não eram visíveis e muitas vezes foram vistos vacúolos dentro das mitocôndrias, principalmente nas células da MCI.

O núcleo das células destes embriões apresentou um nucleoplasma granular, sem corpos precursores nucleolares. O nucléolo estava presente, porém não era tão evidente quanto nos demais tipos de embriões.

Figura 11 – Fotomicrografia eletrônica do embrião bovino partenogenético D7. TE – trofotoderma; ZP – zona pelúcida; MV – microvilosidades; NU – nucléolo; MTa – mitocôndria alongada; MTv – mitocôndria com vacúolo; VS – vesícula de secreção; FG – fagossomo.

5.3.4 Embriões D14

Nos embriões de 14 dias, no hipoblasto, os cortes ultrafinos possibilitam a visualização das organelas citoplasmáticas e o núcleo com um nucléolo bem delimitado (Figura 12a). Dentro da célula existiam vesículas de secreção próximas ao núcleo bem como próximas à membrana plasmática (Figura 12c). Nesta região verificou-se que várias vesículas de fagocitose estavam fundidas a membrana plasmática indicando uma intensa atividade secretória destas células, cujos conteúdos eram liberados no saco vitelino primitivo. Ao redor da membrana nuclear existia uma grande quantidade de mitocôndrias, um indicativo de grande metabolismo energético destas células, bem como de peroxissomos que se apresentaram com formato arredondado com uma região mais eletrondensa central (Figura 12b). No núcleo percebeu-se que não havia formação de heterocromatina o que significa que toda cromatina está em forma de eucromatina. Neste caso, a cromatina se encontrou descondensada o que caracteriza uma atividade de

transcrição gênica, ou seja, uma grande produção de proteínas. O nucléolo destas células mostrou-se grande o que também é um indicativo de grande secreção de proteínas e alta atividade mitótica. Na superfície das células voltada para o saco vitelino primitivo observa-se a presença de inúmeras microvilosidades.

Figura 12 – Fotomicrografia eletrônica de embrião bovino D14 mostrando células do hipoblasto. N – núcleo; n – nucléolo; setas pretas – mitocôndrias; asteriscos – peroxissomos; setas pretas cheias – vesículas de secreção.

5.3.5 Embriões D16

Nos cortes ultrafinos dos embriões de 16 dias, as mesmas estruturas foram encontradas nas células hipoblásticas. O núcleo das células apresenta forma ovoide, alguns mais alongados, e em sua maioria possui dois nucléolos. Na membrana plasmática foram encontradas estruturas de comunicação celular entre as células tais como desmossomos (Figura 13a). Assim como nos embriões D14 foram encontradas microvilosidades na superfície voltada para o saco vitelino primitivo, porém em menor quantidade (Figura 13b). Mitocôndrias também foram facilmente encontradas nestas células e possuíam uma morfologia característica da organela, sem modificações estruturais como as encontradas nos embriões D7 produzidos *in vitro*.

Figura 13 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão do disco embrionário no embrião bovino D16. Em a e b, células do epiblasto; em c e d, células do hipoblasto. N – núcleo; nu – nucléolo; de – desmossomos; mi – microvilosidades; asteriscos – mitocôndrias; setas pretas – vesículas de secreção.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Com base na técnica de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, esse estudo demonstrou a morfologia de embriões bovinos derivados de técnicas de produção *in vitro*, em diferentes idades, e percebeu-se que a morfologia geral destes embriões não diferiu da encontrada nos demais embriões de mamíferos já relatados, como por exemplo, em humanos, ratos e ovinos (CALARCO; McLAREN, 1976; MOHR; TROUNSON, 1982). No entanto, várias diferenças a nível microscópico puderam ser observadas quando se compara os embriões entre si. Nos embriões D7 as células do trofotoderma, que já estavam bem diferenciadas, apresentaram papel importante na formação e crescimento do blastocisto, pois delas depende a aquisição e retenção de fluidos na blastocela (MASSIP et al., 1981). Essa característica esteve bem evidente nos embriões FIV, os quais apresentavam um estado de desenvolvimento dentro do padrão de normalidade.

Os embriões utilizados nesse estudo apresentavam características macroscópicas consideradas normais para o estágio de desenvolvimento e não diferiram muito quando comparados a embriões de monta natural descritos por outros autores (MASSIP et al., 1981). As principais estruturas estavam formadas e nenhuma grande anomalia foi identificada. Essa constatação é esperada uma vez que as maiores alterações sofridas por embriões PIV nos estágios mais iniciais são de ordem microscópica.

Ainda sim, os embriões D7 apresentaram diferença em tamanho, fato este relacionado com a presença da zona pelúcida nos embriões de menor tamanho. Tal diferença se deve ao fato de que a zona pelúcida impede o crescimento do embrião em tamanho, o que passa a acontecer somente depois da sua eclosão (McGEADY et al., 2007; MADDOX-HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010). Este processo ocorre por volta do sétimo dia de desenvolvimento como observado nos embriões aqui utilizados. Os embriões D14 também apresentaram diferenças pequenas de tamanho quando comparados a outros já descritos. Chang (1952) descreve um tamanho de 10mm para o saco gestacional em embriões de monta natural de 14 dias, enquanto nossos dados apontam um tamanho médio de 6,8mm para embriões FIV. No entanto, este dado pode não ser significativo já que o trabalho citado foi realizado apenas com um embrião nesta idade. Tal comparação pode ser feita

também para os embriões D16, cujo tamanho foi semelhante e o disco embrionário foi facilmente identificado, assim como no estudo citado.

Em trabalhos já publicados, o hipoblasto estava totalmente presente revestindo a cavidade blastocística com nove dias, o que nos leva a conclusão que sua formação se inicia por volta do sétimo e oitavo dias (MADDOX-HYTTEL et al., 2003). Em nosso estudo, em relação às células do hipoblasto, demonstrou-se que nos embriões de sete dias essa camada celular ainda não estava em vias de formação, significando que a massa celular interna não estava diferenciada em hipoblasto e epiblasto. Já nos embriões de quatorze e dezesseis dias, o hipoblasto apresentou-se totalmente formado e com morfologia e características próprias destas células já vistas em outros estudos (MADDOX-HYTTEL et al., 2003; VEJLSTED et al., 2005).

As análises ultraestruturais aqui realizadas mostraram pequenas diferenças na morfologia das células dos embriões provenientes de diferentes técnicas. Nestes embriões analisados não foram encontrados corpos apoptóticos nem células em estado degenerativo com já visto em embriões derivados de TNCS ou partenogênese (TALBOT et al., 2000).

Marcadamente as células que constituem o embrião diferiram umas das outras em relação à forma e disposição e quantidade de organelas. Essa é uma diferenciação já prevista e confirmada em outros trabalhos uma vez que cada grupo celular – trofotoderma, MCI, hipoblasto ou epiblasto - apresenta funções específicas no desenvolvimento embrionário (MOHR; TROUNSON, 1982; TALBOT et al., 2000).

As microvilosidades estavam presentes em todos os embriões aqui estudados. Estas estruturas são responsáveis pelo aumento na superfície de absorção das células e são próprias de tecidos onde há intenso transporte de fluidos e nutrientes (ALBERTS et al., 2008). Em todos os embriões aqui estudados ocorreu a presença das microvilosidades no trofotoderma e nas células do hipoblasto, dado esperado e já confirmado em outros trabalhos, pois estes tecidos realizam absorção de substâncias da cavidade celomática e do saco vitelino, respectivamente, para o embrião. Essa é uma característica observada não só em bovinos, mas em todos os blastocistos de mamíferos (PLANTE; KING, 1994).

A presença de fagossomos é um indicativo de atividade de células que estão em processo de diferenciação. Nesse caso, a fagocitose, que ocorre pela ação de

enzimas lisossomais, é empregada principalmente para a remoção de restos celulares característicos de blastocistos em formação (TALBOT et al., 2000). Principalmente, nos embriões partenogenéticos e no hipoblasto dos embriões D14 a presença dos fagossomos foi identificada sugerindo uma alta atividade de degradação de conteúdos celulares nestes embriões.

Estruturas de comunicação celular entre as membranas, tais como junções comunicantes e desmosossomos estão presentes também em todos os blastocistos de mamíferos. A formação dessas junções é importante para a manutenção da aderência e comunicação entre as células, fato característico dos blastocistos no estágio inicial de desenvolvimento os quais estão saindo da fase de compactação promovida pela presença da zona pelúcida, na qual as células estão num ponto de contato bem mais próximo (TALBOT et al., 2000; MADDOX-HYTTEL et al., 2003; VEJLSTED et al., 2005). Nos embriões vistos tais estruturas estão bem desenvolvidas, embora que nos embriões TNCS e partenogenéticos estejam em menor quantidade indicando uma deficiência na comunicação celular.

A presença de vesículas de secreção é bem relatada na espécie bovina. Acredita-se que essa organela, bem como as gotículas de lipídios encontradas nas células dos embriões seja fonte de nutrientes e energia para o embrião que está em pleno desenvolvimento.

Os grânulos corticais vistos nos embriões FIV e TNCS são característicos em zigotos recém-formados, pois fazem parte do processo de bloqueio da poliespermia. Segundo Plante e King (1994), esses grânulos sofrem exocitose, porém a permanência deles no citoplasma por um período maior não acarreta problemas ao desenvolvimento do embrião.

As mitocôndrias foram as organelas que apresentaram as maiores modificações morfológicas entre os embriões. A presença delas em grande quantidade é um resultado esperado devido a grande atividade metabólica e de síntese proteica nas células dos blastocistos. As diferenças na densidade da mitocôndria pode ser resultado da quantidade de RNA presente em seu interior – quanto mais densa, maior a quantidade de RNA. Os vacúolos formados no interior das mitocôndrias podem interferir no metabolismo da célula por aumentar a área de superfície da mitocôndria e consequentemente aumentar a absorção das fontes de energias do citoplasma. As mudanças na morfologia das mitocôndrias já foram evidenciadas em outros estudos com bovinos e espécies diferentes e acredita-se

que tais modificações acarretam também alterações na funcionalidade desta organela (CALARCO; McLAREN, 1976; PLANTE; KING, 1994). Essas mudanças na morfologia podem estar correlacionadas com alteração na atividade metabólica das células que muda também de acordo com o consumo de oxigênio pelas células (TALBOT et al., 2000). Todos os embriões D7 apresentaram tais alterações o que sugere um estado de quiescência das células, diferentemente dos embriões D14 e D16 que apresentaram mitocôndrias sem alterações na forma.

Resumidamente, de acordo com os resultados vistos percebe-se que os embriões D7 derivados de transferência nuclear de células somáticas e os derivados de partenogênese foram os que apresentaram as maiores alterações em sua estrutura macro e microscópica. De forma geral, a massa celular interna não estava bem definida no polo embrionário e seu tamanho estava menor quando comparados aos embriões FIV. Notoriamente, as principais organelas envolvidas em processos de absorção, comunicação, crescimento e metabolismo celular foram afetadas quanto ao número ou quanto à forma, um indicativo de que estes embriões não apresentam um desenvolvimento normal quando são envolvidos na gestação. Em contrapartida, os embriões FIV, em todas idades estudadas, apresentaram algumas modificações apenas ao nível microscópico, mantendo sua morfologia semelhante aos embriões provenientes de monta natural. Tais achados corroboram com os demais já publicados em outros estudos (CALARCO; McLAREN, 1976; MASSIP et al., 1981; PLANTE; KING, 1994; MOHR; TROUNSON, 1982; TALBOT et al., 2000; MADDOX-HYTTEL et al., 2003; VEJLSTED et al., 2005) que também analisaram a morfologia desses tipos de embriões, porém nunca antes tendo comparado embriões nessas idades e derivados das três técnicas aqui abordadas.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Segundo os dados apresentados, podemos concluir que os embriões derivados de produção *in vitro* apresentam diferenças morfológicas quando comparados com embriões de monta natural e entre si. Destes os que mais apresentaram alterações foram os blastocistos D7 derivados de transferência nuclear de células somáticas e partenogênese. Tais alterações certamente têm graves implicações para o desenvolvimento do embrião/feto, uma vez que afetaram organelas importantes para o crescimento e metabolismo celular.

As células do hipoblasto também sofreram alterações em sua ultraestrutura. Esse tecido, aqui presente somente nos embriões D14 e D16 apresentou modificações de ordem microscópica que podem interferir no desenvolvimento normal do embrião, principalmente pela demonstração que estas células participam ativamente da manutenção da gestação em bovinos.

Referências

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 5. ed. New York: Garland Science, 2008. 1268 p.

ASSIS NETO, A. C. **Desenvolvimento placentário em bovinos obtidos por gestações naturais e por fecundação *in vitro***. 2005. 223 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ASSIS NETO, A. C.; PEREIRA, F. T. V.; SANTOS, T. C.; AMBROSIO, C. E.; LEISER, R.; MIGLINO, M. A. Morpho-physical recording of bovine conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 5, p. 760-772, 2010.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. **Reprodução em bovinos**. São Paulo: Roca, 2006.

BEIGUELMAN, B. *Estudo de Gêmeos*. 2000. Disponível em: <<http://www.desvirtual.com/bbeiguel/ebook.htm>> Acesso em: 21 de fev. 2011.

BIELINSKA, M.; NARITA, N.; WILSON, D. B. Distinct roles for visceral endoderm during embryonic mouse development. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 43, n. 3, p.183-205,1999.

CALARCO, P. G.; McLAREN, A. Ultrastructural observations of preimplantation stages of sheep. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 36, n. 3, p. 609-622, 1976.

CERVANTES, S.; YAMAGUCHI, T. P.; HEBROK, M. Wnt5a is essential for intestinal elongation in mice. **Developmental Biology**, v. 326, n. 2, p. 285-294, 2009.

CHANG, M. C. Development of bovine blastocyst with a note on implantation. **The Anatomical Record**, v. 113, n. 2, p. 143-161, 1952.

CHAPMAN, S. C.; MATSUMOTO, K.; CAI, Q.; SCHOENWOLF, G. C. Specification of germ layer identity in the chick gastrula. **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 91-106, 2007.

EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; McCracken, M. D.; VAN AMSTEL, S. R.; HOPKINS, F. M.; WELBORN, M. G.; DAVIES, C. J. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, n. 2, p. 113-123, 2003.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Erros in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 178-191, 2006.

FILLIERS, M.; SPIEGELAERE, W.; PEELMAN, L.; GROOSSENS, K.; BURVENICH, C.; VANDAELE, L.; CORNILLIE, P.; SOOM, A. V. Laser capture microdissection for gene expression analysis of inner cell mass and trophoblast from blastocysts. **Analytical Biochemistry**, v. 408, n. 1, p. 169-171, 2011.

GRAPIN-BOTTON, A.; MELTON, D. A. Endoderm development from patterning to organogenesis. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 3, p. 124-130, 2000.

HALL, V. J.; JACOBSEN, J. V.; RASMUSSEN, M. A.; MADDOX-HYTTEL, P. Ultrastructural and molecular distinctions between the porcine inner cell mass and epiblast reveal unique pluripotent cell states. **Developmental Dynamics**, v. 239, n. 11, p. 2911-2920, 2010.

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T.; SPENCER, T. E.; THOMPSON, J. A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 6, p. 1787-1794, 2000.

JOHANSSON, B. M.; WILES, M. V. Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 1, p. 141-151, 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KLUTH, D.; JAESCHKE-MELLI, S.; FIEGEL, H. The embryology of gut rotation. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 12, p. 275-279, 2003.

KUBO, A.; SHINOZAKI, K.; SHANNON, J. M.; KOUSKOFF, V.; KENNEDY, M.; WOO, S.; FEHLING, H. J.; KELLER, G. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. **Development**, v. 131, n. 7, p. 1651-1662, 2003.

KWEK, J.; DE IONGH, R.; NICHOLAS, K.; FAMILARI, M. Molecular insights into evolution of the vertebrate gut: focus on stomach and parietal cells in the marsupial, *Macropus eugenii*. **Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)**, v. 312, n. 6, p. 613-624, 2009.

LINDNER, G. M.; WRIGHT JR., R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, n. 4, p. 407-416, 1983.

MASSIP, A.; MULNARD, J.; HUYGENS, R.; HANZEN, C.; VAN DER ZWALMEN, P.; ECTORS, F. Ultrastructure of the cow blastocyst. **Journal of Submicroscopic and Cytology**, v. 13, n. 1, p. 31-40, 1981.

MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N. I.; VAJTA, G.; LEWIS, I.; ROGERS, P.; CANN, L.; CALLESEN, H.; TVEDEN-NYBORG, P.; TROUNSON, A. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial posthatching development of bovine embryos. **Reproduction**, v. 125, p.607-623, 2003.

MADDOX-HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Essentials of Domestic Animal Embryology**. London: Saunders Elsevier, 2010. 455p.

MADDOX-HYTTEL, P.; SVARCOVA, O.; LAURINCIK, J. Ribosomal RNA and nucleolar proteins from the oocyte are to some degree used for embryonic nucleolar formation in cattle and pig. **Theriogenology**, v. 68, n. 1, p. 63-70, 2007.

McGEADY, T. A.; QUINN, P. J.; FITZPATRICK, E. S.; RYAN, M. T. **Veterinary Embryology**. Blackwell Publishing: Iowa, 2006. 377 p.

MOHR, L. R.; TROUNSON, A. O. Comparative ultrastructure of hatched human, mouse and bovine blastocysts. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 66, n. 2, p. 499-504, 1982.

MONTGOMERY, R. K.; MULBERG, A. E.; GRAND, R. J. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. **Gastroenterology**, v. 116, n. 3, p. 702-731, 1999.

MOORE, K. L.; PERSUAD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 7. ed. Ed. Elsevier Ltda, 2004. 609 p.

OESTRUP, O.; GJOERRET, J.; SCHAUSER, K.; SCHIMIDT, M.; HALL, V.; MADDOX-HYTTEL, P. Characterization of bovine epiblast-derived outgrowth colonies. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 4, p. 625-633, 2010.

OZAWA, M.; HANSEN, P. J. A novel method for purification of inner cell mass and trophectoderm cells from blastocysts using magnetic activated cell sorting. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 2, p. 799-802, 2011.

PLANTE, L.; KING, W. A. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by *in vitro* and *in vivo* fertilization. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 11, n. 10, p. 515-529, 1994.

RED-HORSE, K.; ZHOU, Y.; GENBACEV, O.; PRAKOBPHOL, A.; FOULK, R.; McMASTER, M.; FISHER, S. J. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the materno-fetal interface. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 6, p. 744-754, 2004.

ROSSANT, J.; TAM, P. P. L. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. **Development**, v. 136, n. 5, p. 701-713, 2009.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 229-233, 2007. Suplemento especial.

SHIVDASANI, R. A. Molecular regulation of vertebrate early endoderm development. **Developmental Biology**, v. 249, n. 2, p. 191-203, 2002.

SPENCE, J. R.; LAUF, R.; SHROYER, N. F. Vertebrate intestinal endoderm development. **Developmental Dynamics**, v. 240, p. 501-520, 2011.

TALBOT, N. C.; BLOMBERG, L. A.; MAHMOOD, A.; CAPERNA, T. J.; GARRETT, W. M. Isolation and characterization of porcine visceral endoderm cell lines derived from *in vivo* 11-day blastocysts. **In vitro Cellular and Development Biology – Animal**, v. 43, n. 2, p. 72-86, 2007.

TALBOT, N. C.; CAPERNA, T. J.; POWELL, A. M.; EALY, A. D.; BLOMBERG, L. A.; GARRETT, W. M. Isolation and characterization of bovine visceral endoderm cell lines derived from a parthenogenetic blastocyst. **In vitro Cellular and Development Biology – Animal**, v. 41, n. 5-6, p. 130-141, 2005.

TALBOT, N. C.; POWELL, A. M.; GARRETT, W. M.; EDWARDS, J. L.; REXROAD JR, C. Ultrastructural and karyotypic examination of *in vitro* produced bovine embryos developed in the sheep uterus. **Tissue e Cell**, v. 32, n. 1, p. 9-27, 2000.

TAM, P. P. L.; KANAI-AZUMA, M.; KANAI, Y. Early endoderm development in vertebrate: lineage differentiation and morphogenetic function. **Current Opinion in Genetics e Development**, v. 13, n. 4, p. 393-400, 2003.

VEJLSTED, M.; AVERY, B.; SCHIMDT, M.; GREVE, T.; ALEXOPOULOS, N.; MADDOX-HYTTEL, P. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the bovine epiblast. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 3, p. 678-686, 2005.

WELLS, J. M.; MELTON, D. A. Vertebrate endoderm development. **Cell and Developmental Biology**, v. 15, p. 393–410, 1999.

WOLF, E.; ARNOLD, G. J.; BAUERSACHS, S.; BEIER, H. M.; BLUM, H.; EINSPIANIER, R.; FRÖHLICH, T.; HERRLER, A.; HEINDLEDER, S.; KÖLLE, S.; PRELLE, K.; REICHENBACH, H-D.; STOJKOVIC, M.; WENIGERKIND, H.; SINOWATZ, F. Embryo-maternal communication in bovine – strategies for deciphering a complex cross-talk. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 276-289, 2003.