

## COCULTURA DE EMBRIÕES *Mus musculus* COM MONOCAMADAS DE CÉLULAS DE LINHAGENS PRIMÁRIA E CONTÍNUA EM UM SISTEMA SEM FLUXO EXTERNO DE CO<sub>2</sub>

### COCULTURE OF *Mus musculus* EMBRYOS WITH MONOLAYERS OF PRIMARY AND CONTINUOUS LINEAGES IN A SYSTEM WITHOUT EXTERNAL CO<sub>2</sub> FLOW

Marcos Antônio Lemos Oliveira<sup>1</sup> Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>2</sup>  
Paulo Fernandes de Lima<sup>3</sup> Benjamin Gaylord Brackett<sup>4</sup>

#### RESUMO

A eficiência de três monocamadas celulares (linhagem contínua - células Madin and Darby Bovine Kidney/ MDBK; linhagem primária - células de útero e de oviduto bovino) foi testada para verificar a existência de especificidade celular através do desenvolvimento de embriões, desde o estágio de duas células até o de mórula compacta, em um sistema de cocultura sem fluxo externo de CO<sub>2</sub>. Depois da seleção, os embriões (n = 343) foram aleatoriamente distribuídos em diferentes tubos de ensaio, os quais foram colocados a 37°C durante 72 horas. Após o período de cocultura, as porcentagens de mórulas compactas obtidas foram de 87,7% em células de oviduto, 86,2% na monocamada de células uterinas e 88,3% na de células MDBK. Não foi observada diferença significativa entre esses valores e, por isso mesmo, conclui-se que a especificidade celular não é importante para o desenvolvimento *in vitro* de embriões *Mus musculus*.

**Palavras-chave:** embrião, *Mus musculus*, células do útero, células do oviduto, células MDBK.

#### SUMMARY

The efficiency of three monolayers (continuous lineage - Madin and Darby Bovine Kidney/ MDBK; primary

lineage - bovine cells from uterus and oviduct) has been tested to verify the cellular specificity through development of two cells embryos until compact morulae stage in a coculture system without continuous CO<sub>2</sub> flow. The selected mouse embryos (n=343) were randomly divided into three experimental groups and placed in closed culture tubes maintained at 37°C during 72 hours. After the co-culture period, the percentages of compact morulae were 87.7% in oviduct cells, 86.2% in uterus monolayer and 88.3% in MDBK cells. It was not observed significant difference between these results and it is possible to conclude that cellular specificity is not important to enhance the *In vitro* development of *Mus musculus* embryos.

**Key words:** embryo, *Mus musculus*, oviduct cells, uterine cells, MDBK cells.

#### INTRODUÇÃO

A elaboração de um sistema de cocultura de embriões mamíferos que simule um ambiente totalmente compatível ou bastante próximo do ambiente materno é a principal motivação dos pesquisadores visando obter o desenvolvimento *in*

<sup>1</sup>Médico Veterinário, Professor Adjunto MsC., Doutor, Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Av. D. Manoel de Medeiros, S/Nº, Dois Irmãos, 52171-900 - Recife, PE. Autor para correspondência.

<sup>2</sup>Médico Veterinário, Professor Assistente (MsC.) do DMV da UFRPE.

<sup>3</sup>Médico Veterinário, Professor Adjunto (MsC.) do DMV da UFRPE.

<sup>4</sup>DVM. PhD, Georgia University. Athens-Georgia, USA.

*vitro* de embriões sem perda de qualidade. Assim, diversos tipos de meio de cultura e, em especial, de monocamadas celulares vêm sendo testados (SAKKAS & TROUNSON, 1990; PEREIRA, 1991; RIBEIRO, 1991; GUERRA, 1992; OLIVEIRA *et al.* 1996) para eliminar, ou mesmo minimizar os efeitos indesejáveis produzidos pelos sistemas de cocultura.

A real função da monocamada celular continua indefinida (KIM *et al.*, 1989), entretanto, independentemente da especificidade celular (PEREIRA, 1991; RIBEIRO, 1991), tem-se mostrado indispensável na cocultura de embriões *Mus musculus* (RIBEIRO, 1991). Essa necessidade pode ser em consequência de proporcionarem estímulos que regulam o metabolismo embrionário (REXROAD Jr., 1989), de fornecerem fatores embriotróficos ou de removerem substâncias tóxicas ao embrião contidas no meio de cultura (KUZAN & WRIGHT JR., 1982) ou ainda em decorrência de liberarem substâncias altamente lábeis que viabilizam o desenvolvimento *in vitro* dessas estruturas (KUZAN & WRIGHT JR., 1982), haja visto a necessidade de contato direto entre o embrião e a monocamada celular (BIGGERS *et al.*, 1957; ALLEN & WRIGHT Jr., 1984; RIBEIRO, 1991).

O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência de diferentes monocamadas celulares (linhagem contínua - Madin and Darby Bovine Kidney; linhagem primária - células do útero e do oviduto de bovinos) sobre a obtenção de mórulas compactas da espécie *Mus musculus* após 72 horas de cocultura.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os animais da espécie *Mus musculus*, submetidos a 14 horas de luz/dia em ambiente a 22°C, receberam ração e água fornecidas *ad libitum*, além de amendoim e sementes de girassol como complemento alimentar. Os machos foram alojados em gaiolas individuais e as fêmeas (máximo de cinco) em gaiolas coletivas, onde receberam, através de administração intraperitoneal, 10UI de Gonadotropina Coriônica Equina<sup>a</sup> (eCG) às 15:00 horas e 10UI de Gonadotropina Coriônica Humana<sup>b</sup> (hCG) decorridas 46 horas da aplicação do eCG. Imediatamente após a administração do hCG, as fêmeas eram colocadas nas gaiolas dos machos para acasalamento e na manhã seguinte observava-se a presença de placa vaginal para constatação da cobertura.

Após sacrifício das fêmeas por deslocamento da coluna cervical, os ovidutos juntamente com a porção craneal dos cornos uterinos foram dissecados e acondicionados em placas de petri para que fossem

realizadas a lavagem e a colheita das estruturas. Imediatamente após, os embriões no estágio de duas células foram transferidos para um vidro de relógio contendo solução fisiológica acrescida de 20% de soro fetal bovino<sup>c</sup> (SFB) com a finalidade de se proceder a avaliação da qualidade embrionária conforme as características morfológicas sugeridas por STRINGFELLOW *et al.* (1987).

As monocamadas de células do útero e oviduto de bovinos, bem como a de células Madin and Darby Bovine Kidney (MDBK) foram preparadas modificando-se a técnica empregada por SOTOBELAZO *et al.* (1976) conforme descrito por OLIVEIRA *et al.* (1986). A suplementação do meio de cultura TCM 199/25mM HEPES<sup>d</sup> com 20% de soro inativado de vaca no proestro (BRACKETT *et al.*, 1989), foi substituída por 20% de SFB.

Dos embriões colhidos, apenas os classificados como bons ou excelentes (n = 343) foram aleatoriamente distribuídos em tubos de ensaio (máximo de dez estruturas) contendo 2ml de meio de cultura e monocamada celular. Após fechamento hermético desses tubos de ensaio, os embriões foram colocados em estufa bacteriológica<sup>e</sup> a 37° C durante 72 horas, período em que foram diariamente avaliados quanto aos aspectos da qualidade e do desenvolvimento.

A influência das diferentes monocamadas de células sobre o desenvolvimento embrionário foi avaliada empregando-se a tabela de contingência (2x3) do teste de QUI-QUADRADO, considerando-se o nível de 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esperava-se que as duas monocamadas de células de linhagem primária apresentassem melhor performance sobre o desenvolvimento embrionário do que a de linhagem contínua em decorrência de tomarem o ambiente da cocultura mais compatível com o de origem materna. Sob condições fisiológicas, os embriões de camundongos permanecem no oviduto até os estádios de mórula final e blastocisto inicial (HAFEZ, 1988) e, assim sendo, deveriam sofrer, quando em cocultura, os efeitos benéficos das secreções especializadas das monocamadas de células de linhagem primária. Todavia, não foi registrado diferença significativa entre as porcentagens de embriões que alcançaram o estágio de mórula compacta (Tabela 1), resultados contrários aos de GANDOLFI & MOOR (1987) e OVERSKEY & CINCOTA (1987) quando relataram ter verificado que as células de linhagem primária são mais eficientes para a cocultura de embriões.

Tabela 1 - Desenvolvimento de embriões desde o estágio de duas células até o de mórula compacta após 72 horas de incubação a 37°C em diferentes monocamadas celulares com o meio de cultura TCM 199/25mM HEPES.

Monocamadas	Mórula Compacta		Degenerados		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Oviduto	100	(87,7)	14	(12,3)	114	(100)
Útero	94	(86,2)	15	(13,8)	109	(100)
MDBK	106	(88,3)	14	(11,7)	120	(100)

(Teste  $\chi^2 = 0,24$ ;  $P > 0,05$ )

BIGGERS *et al.* (1957) e PAUL (1970) não recomendam a utilização da monocamada celular de linhagem contínua para a cocultura de embriões devido esse tipo de célula diferir da monocamada que a originou e REXROAD Jr. (1989) relata que este tipo de monocamada pode comprometer o desenvolvimento embrionário em virtude de sofrer modificação química e morfológica em sua estrutura. Por outro lado, RIBEIRO (1991) após verificar que a monocamada de células MDBK determinava um menor número de embriões degenerados do que a de células uterinas, atribuiu esse achado ao fato das células de linhagem contínua produzirem uma tensão de CO<sub>2</sub>; mais adequada para manter o pH do meio de cultura em nível desejável. Já PEREIRA (1991) e GUERRA (1992) não registraram diferença entre as performances das monocamadas de linhagem primária e contínua.

Os resultados deste trabalho não evidenciaram também diferença significativa quanto ao número de estruturas degeneradas entre os três grupos experimentais (Tabela 1). É oportuno salientar que tanto nesta pesquisa quanto na de RIBEIRO (1991), o sistema de cocultura empregado tinha o metabolismo celular como única fonte de CO<sub>2</sub>. O alto grau de desenvolvimento populacional das células de linhagem contínua relatado por KOSEKI & ABHAB (1979) e justificado por RIBEIRO (1991) como sendo, possivelmente, o responsável pela eficiente produção de CO<sub>2</sub>; para proporcionar um ambiente mais compatível com o materno, não foi aqui verificado. Talvez, a diferença esteja relacionada com o tipo de meio de cultura utilizado, pois, enquanto RIBEIRO (1991)

utilizou o MEM/ EAGLE, nesta pesquisa foi usado o TCM 199/25mM contendo HEPES, substância que tem a finalidade de manter o pH relativamente constante sem suprimento externo de CO<sub>2</sub> (KANE, 1979), impedindo que ocorresse um discrepante número de embriões degenerados entre as três diferentes monocamadas celulares.

Do mesmo modo que neste experimento, a especificidade celular não foi importante quando as eficiências das monocamadas de linhagem primária e contínua foram comparadas, também não foi ao serem avaliadas as performances das monocamadas de células do útero e de oviduto entre si. Este achado corrobora os dados de PEREIRA (1991), RIBEIRO (1991) e GUERRA (1992) que trabalhando, respectivamente, com embriões de oito células, mórulas e blastocistos e com estruturas de duas células registraram que a especificidade celular é fundamental para o desenvolvimento *in vitro* de embriões *Mus musculus*. Entretanto, os resultados aqui obtidos são contrários aos de SAKKAS & TROUNSON (1990) que constataram maior eficiência da monocamada de células de oviduto do que da monocamada de células uterinas na cocultura de zigotos murinos.

É possível admitir que o importante para favorecer o desenvolvimento embrionário, sob condições artificiais, é o contato direto entre o embrião e a monocamada celular como referiram-se BIGGERS *et al.* (1957), BALL *et al.* (1983), ALLEN & WRIGHT Jr. (1984), e RIBEIRO (1991). Esse contato permite que fatores de crescimento da monocamada celular (BRIGSTOCK *et al.*, 1983) e estímulos que regulam o metabolismo embrionário (REXROAD Jr., 1989) penetrem na zona pelúcida e alcancem a superfície das células embrionárias (ALLEN & WRIGHT Jr., 1984). Outro aspecto importante e que também deve ser levado em consideração é o fato das monocamadas celulares removerem substâncias tóxicas contidas no meio de cultura e de liberarem substâncias altamente lábeis que viabilizam o desenvolvimento embrionário (KUZAN & WRIGHT Jr, 1982).

Tendo em vista que o resultado não evidenciou qualquer diferença significativa entre as performances das monocamadas celulares, conclui-se que, em se tratando da cocultura de embriões *Mus musculus* a partir do estágio de duas células, tanto pode ser utilizada a monocamada de células de linhagem primária (oviduto ou útero) quanto a de células de linhagem contínua (MDBK).

**FONTES DE AQUISIÇÃO**

- <sup>a</sup> Intergonan - Vemie Veterinar Chemie GmbH - RFA.  
<sup>b</sup> Pregnyl - Laboratório Organon do Brasil Ltda - BR.  
<sup>c</sup> Cutilab - BR.  
<sup>d</sup> Sigma Chemical Co. - USA.  
<sup>e</sup> Fabbe, Primar - BR.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALLEN, R.L., WRIGHT JR., R.W. In vitro development of porcine embryos in coculture with endometrial cell monolayer of culture supernatants. **J Anim Sci**, v. 59, n. 6, p. 1657-1661, 1984.
- BALL, G.D., LEIBFRIED, M.L., LENZ, R.W., AX, R.L., BAVISTER, B.D., FIRST, N.L. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **Biol Reprod**, v. 28, p. 717-725, 1983.
- BIGGERS, J.D., RINALDINI, L.M., WEEB, M. The study of growth factors in tissue culture **Symp Exp Biol**, p. 264-297, 1957.
- BRACKETT, B.G., YOUNIS, A.I., FAYRER-HOSKEN, R. Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro with high concentrations of luteinizing hormone. **Fértil Steril**, v. 52, p. 319-324, 1989.
- BRIGSTOCK, D.R., BROWN, K.D., HEAP, R.B., *et al.* Cell growth promoting polypeptides in the uterus of the pig. **J Physiology**, v. 343, p. 126, 1983.
- GANDOLFI, F., MOOR, R.M. Stimulation of early embryonic development in the sheep by coculture with oviduct epithelial cells. **J Reprod Fértil**, v. 81, p. 23-28., 1987.
- GUERRA, M.M.P. **Obtenção in vitro de mórulas e blastocistos a partir de embriões murinos com duas células**. Recife - PE, 70 p. Dissertação (Mestrado em Clínica da Reprodução) - Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1992.
- HAFEZ, E.S.S. Ciclos reprodutivos. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 4. ed. São Paulo: Manieie, 1988. Cap. 3, p.387-518.
- KANE, M.T. Fatty acids as energy sources for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae. **Bio Reprod**, v. 20, p. 323-332, 1979.
- KIM, H.N., HU, Y.X., ROUSSEL, J.D, *et al* Culturing murine embryos on bovine fetal spleen cell fibroblast and chick embryofibroblast monolayers. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 211, 1989.
- KOSEKI, I., ABUHAB, T.G. Isolamento de linhagens celulares bovinas e suscetibilidade ao vírus da febre aftosa. **Arq Instit Biol**, v. 46, n. 1/2, p. 45-54, 1979.
- KUZAN, F.B., WRIGHT Jr, R.W. Blastocysts expansion, hatching and attachment of porcine embryos coculture with bovine fibroblasts in vitro. **Anim Reprod Sci**, v. 5, p. 57-63, 1982.
- OLIVEIRA, M.A.L., GUERRA, M.M.P., BRACKETT, B.G. Renovação parcial do meio de cultura como perspectiva de aumentar a eficiência de um sistema de cocultura de embriões sem fluxo contínuo de CO<sub>2</sub>. **Ciência Rural**, v. 26, n. 3, p. 451-455, 1996.
- OVERSKEY, T.L., CINCOTA, A.H. New approach to embryo coculture. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, 1987.
- PAUL, J. **Cell and tissue culture**. London, Churchill Livingstone, 1975. 484 p.
- PEREIRA, R.J.T.A. **Influência da monocamada celular e do meio de cultura sobre o desenvolvimento in vitro de embriões murinos de oito células**. Recife - PE, 61 p. Dissertação (Mestrado em Clínica da Reprodução) - Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1991.
- REXROAD JR., C.E. Coculture of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 105-114, 1989.
- RIBEIRO, V.M.F. Cultivo de embriões murinos em monocamadas celulares e em meio suplementado com soro fetal bovino. Recife - PE, 92 p. Dissertação (Mestrado em Clínica da Reprodução) - Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1991.
- SAKKAS, D., TROUNSON, A.O. Co-culture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pseudopregnancy. **J Reprod Fértil**, v. 90, p. 109-118, 1990.
- SOTO-BELOZO, E.R., ARCHBALD, L.F., ZEMJANIS, R. Development of a cell culture line of bovine fetal endometrial cells. **Am J Vet Res**, v. 37, n. 9, p. 1103-1105, 1976.
- STRONGFELLOW, D.A., THOMSON, M.S., RIDDEL, K.P. Morphological characteristics and quality assessment of transfer stage bovine embryo. **Álbum Vet**, v. 42, n. 2, p. 6-10, 1987.