

TÉCNICA DE TUNEL EM EMBRIÕES DE RATAS WISTAR: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E DA CAPACIDADE DE DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES

TUNEL TECHNIQUE IN WISTAR RATS EMBRYOS: EVALUATION OF QUALIFY AND DEVELOPMENT CAPACITY OF EMBRYOS

Juliana Polisseni*, Raquel Varela Serapião**, Paulo Henrique de Almeida Campos Júnior***, João Gabriel Viana de Grázia****, Larissa Cabral Milen#, Luis Sérgio de Almeida Camargo##, Martha de Oliveira Guerra###, Vera Maria Peters####

RESUMO

A técnica do TUNEL tem se mostrado eficiente como indicadora de qualidade embrionária em embriões bovinos e de camundongos. Entretanto, em ratos, a técnica não é amplamente utilizada. Objetivou-se avaliar a qualidade do desenvolvimento de embriões de ratas Wistar e o uso da técnica de TUNEL. Animais (n=8) foram superovulados através da injeção intraperitoneal de 150 UI/kg de peso via intraperitoneal (IP) de PMSG (Pregnant Mare Gonadotropin) e de 75 UI/kg de hCG 48h após. Fêmeas superovuladas foram colocadas para acasalar. 107 embriões de 4-8 células foram coletados 72 horas após hCG e cultivados em meio KSOM com 5% albumina sérica humana (BSA), em incubadora com 5% de CO₂, 95% de umidade a 37,0°C, por 48 horas. Após o cultivo, foi calculada a taxa de blastocisto e realizada a técnica do TUNEL. A taxa de blastocisto foi de 83,17% (89/107), com 19,62% (21/107) de blastocisto inicial, 14,01% (15/107) de blastocisto, e 49,53% (53/107) de blastocisto expandido. O número total de blastômeros foi de 28,82±4,76. A taxa apoptótica foi de 10,32 ± 8,91% e 94% (31/34) dos embriões apresentavam pelo menos uma célula apoptótica. Em conclusão, a técnica de TUNEL se mostrou viável na avaliação da qualidade embrionária de embriões de ratas Wistar.

PALAVRAS - CHAVE

Blastocisto. apoptose. desenvolvimento embrionário. TUNEL.

ABSTRACT

The TUNEL technique has proven to be efficient as indicator of embryo quality in cattle and mice. Although the technique is not yet widely used in rats. Thus the aim of this study was to evaluate the quality of Wistar rat embryos and the use of the TUNEL technique. Animals (n=8) were superovulated by intraperitoneal injection of 150 IU/kg PMSG (Pregnant Mare Gonadotropin) and 75 IU/kg 48h after hCG. Superovulated females were placed with males at a ratio of 1/1. 107 4-8 cells embryos were collected 72 hours after hCG and were cultured in KSOM medium with 5% bovine serum albumin (BSA), for 48h, with 5% CO₂, 95% humidity at 37.0°C. After cultured, the blastocyst rate was calculated and the TUNEL technique was performed. The blastocyst rate was 83.17% (89/107), with 19.62% (21/107) of initial blastocyst, 14.01% (15/107) of blastocyst and 49.53% (53 / 107) of expanded blastocyst. The total number of blastomeres was 28.82 ± 4.76. The apoptotic cells rate was 10.32 ± 8.91% and 94% (31/34) of embryos had at least one apoptotic cell. In conclusion, the TUNEL technique showing that it can be used to evaluation embryo quality, in Wistar rats embryos.

KEY WORDS

Blastocyst. apoptotic. embryo development. TUNEL.

* Doutoranda do curso de Pós-graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). jupol@powermail.com.

** Pesquisador da Embrapa Gado de Leite do Laboratório de Reprodução Animal. rserapis@yahoo.com.br.

*** Estagiário do laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite. phacj@ig.com.br.

**** Estagiário do Centro de Biologia da Reprodução, UFJF. jggrazia@gmail.com.

Estagiário do Centro de Biologia da Reprodução, UFJF. larissamilen@yahoo.com.br.

Pesquisador da Embrapa Gado de Leite do Laboratório de Reprodução Animal. camargo@cnppl.embrapa.br.

Pesquisador do Centro de Biologia da Reprodução Animal, UFJF. martha.guerra@uff.edu.br.

Pesquisador do Centro de Biologia da Reprodução Animal, UFJF. Peters.vera@uff.edu.br.

Correspondence author: Juliana Polisseni. Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro de Biologia da Reprodução, Campus Universitário, Caixa Postal 328, CEP 36001-970, Juiz de Fora, MG – Brasil. jupol@powermail.com.

Received: 18/06

Accepted: 11/08

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da biologia molecular tem propiciado uma melhor compreensão dos mecanismos biológicos celulares. A apoptose, forma programada de morte celular, é um processo de regulação de populações e linhagens celulares nos sistemas de mamíferos. É caracterizada por fragmentação citoplasmática e nuclear, condensação de cromatina e fagocitose (VANDAELE et al., 2007).

Uma técnica que tem se mostrado eficiente na marcação de células apoptóticas embrionárias é o TUNEL. Esta consiste na utilização da enzima terminal deoxinucleotidil transferase (TdT) – mediada d-UTP nick end-labelling, que promove a ligação da

fluoresceína na 3'OH do DNA degradado (BYRNE et al., 1999). Através da relação de número de blastômeros intactos com o número de blastômeros danificados e o índice apoptótico, é possível avaliar a qualidade do desenvolvimento embrionário (KELKAR; DHARMA; NANDEDKAR, 2003).

Ultimamente, tem-se relacionado a apoptose celular às condições desfavoráveis a que o embrião é submetido durante o processo de cultivo *in vitro*. Acredita-se que este processo de morte celular tem a função de eliminar embriões anormais durante o primeiro ciclo celular em camundongos e no segundo ciclo celular em bovinos e humanos. Portanto, a apoptose tem sido utilizada como indicadora de qualidade embrionária (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002; VANDAELE et al., 2007).

Desta forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade do desenvolvimento de embriões de ratas Wistar, avaliando a taxa de blastocisto e utilizando a técnica do TUNEL para detecção de células apoptóticas nos embriões.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizadas oito ratas Wistar (n=8) com peso médio de 170,0 g e aproximadamente 12 semanas de vida, provenientes do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), Juiz de Fora, MG. Os animais foram mantidos em gaiolas dispostas em estantes climatizadas, com temperatura de 21°C, submetidas ao ciclo claro/escuro de 12 horas e tiveram livre acesso à água e ração.

2.2 SUPEROVULAÇÃO, COLETA EMBRIONÁRIA

Os animais foram superovulados através da injeção intraperitoneal de 150 UI/kg de peso de PMSG (Pregnant Mare Gonadotropin) e após 48h, a indução da ovulação foi realizada com 75 UI/kg de hCG (Human Chorionic Gonadotropin) (KAGABU; UMEZU, 2006). Imediatamente após a superovulação, as fêmeas foram separadas em gaiolas e colocadas com machos de fertilidade comprovada, na proporção de um macho para uma fêmea. Na manhã do dia seguinte, foi realizado o esfregaço vaginal com a finalidade de verificar a cópula. Para a coleta dos embriões, 72hs após hCG, as fêmeas foram eutanasiadas utilizando-se sobredose de anestésico (KON et al., 2005). Os embriões recuperados, através da lavagem dos ovidutos e cornos uterinos, foram cultivados em meio KSOM suplementado com 5% de albumina sérica bovina (BSA) em estufa incubadora com 5% de CO₂, 95% de umidade a 37,0°C, por 48 horas (KON et al., 2005; KAGABU; UMEZU, 2006).

2.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA

A taxa de produção de blastocisto foi avaliada quarenta e oito horas após o início do cultivo embrionário, segundo os parâmetros descritos no Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (STRINGFELLOW; CROWE, 1998).

A verificação do índice apoptótico foi realizada segundo KADER et al.,(2008). Blastocistos de ratas Wistar foram lavados em PBS acrescido de 0,1% de BSA e fixados em formaldeído a 4% a 4°C, por 25 minutos. Após o processo de fixação, os embriões foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,2%) por 5 minutos, lavados e equilibrados em tampão de equilíbrio por 5 a 10 minutos. Em seguida, foram incubados em tampão de incubação (tampão de equilíbrio, mix de nucleotídeo e enzima rTdT) por 1h a 37°C em atmosfera umidificada. Para controle da reação foi confeccionado um controle negativo, no qual o tampão de incubação a enzima rTdT foi substituído por água para não ocorrer a reação. Após o período de incubação, os embriões foram transferidos para lâmina siliconizada, corados com VECTASHIELD e DAPI, recobertos com lamínula e observados em microscópio de fluorescência. O número total de células foi obtido a partir da observação das células coradas pelo DAPI e visualizados em azul no filtro 460nm. Células em apoptose foram identificadas pela fluoresceína, corando-se de cor verde, observadas através do filtro 520±20nm. O índice apoptótico foi calculado a partir da relação do número total de células e o número de células apoptóticas, através do programa IMAGEJ. Já a taxa de produção de blastocisto foi expressa em porcentagem. As variáveis descontínuas foram normalizadas através da transformação logarítmica (número de blastômeros apoptóticos) e de arco seno (taxa de apoptose) e foram submetidas à ANOVA a 5% de significâncias, com auxílio do software SAEG.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da UFJF, recebendo o número do protocolo 002/2009.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o potencial de desenvolvimento e qualidade embrionária, através da taxa de produção de blastocisto e número de células apoptóticas, utilizando-se embriões de ratas Wistar. Foram coletados 107 embriões, no estágio de 4-8 células, em oito ratas Wistar superovuladas. O Quadro 1 mostra o número de embriões, por estágio de desenvolvimento, após 48 horas de cultivo. A taxa de blastocisto foi semelhante à encontrada por KADER et al. (2008), demonstrando que o cultivo foi eficiente no que diz respeito ao desenvolvimento embrionário.

Para análise de células apoptóticas, através da técnica de TUNEL, 34 embriões foram fixados (Figura 1A). A fragmentação no blastocisto foi identificada conforme se verifica na Figura 1B, observa-se o controle onde a enzima foi omitida na Figura 1C. O índice apoptótico por blastocisto encontra-se no Quadro 2.

É verdade que a qualidade de embriões cultivados *in vitro* ainda apresenta características morfológica e fisiológica inferiores aos produzidos *in vivo*. As alterações ultra-estruturais observadas com mais frequência são: redistribuição de organelas na região cortical e agregação citoplasmática, vacuolização e rompimento da membrana e/ou matriz mitocondrial, culminando num processo de apoptose e morte celular (LI et al., 2000). A condição desfavorável encontrada no cultivo *in vitro* foi demonstrada, neste estudo, pela presença de pelo menos uma célula apoptótica em 94% (31/34) dos embriões. O resultado está de acordo com resultados encontrados na literatura, onde foi demonstrada uma taxa de 87% de apoptose para embriões de bovinos (LEE et al., 2009). O número de células apoptóticas também foi semelhante ao encontrado no estudo de KADER, et al. (2008), que utilizou blastocistos de camundongos.

É importante ressaltar que, independente do modelo experimental utilizado, nem sempre a morte celular ocorre em função de efeitos extracelulares, mas também pode estar relacionada a efeitos fisiológicos intracelulares como: estímulos, sinalização entre células e regulação (LI et al., 2009).

Os resultados encontrados indicam a possibilidade de se realizar a avaliação da qualidade embrionária de embriões de ratas através da produção de blastocisto e número de células apoptóticas. Este fato tem grande importância já que, através da análise comparativa preliminar do genoma humano, foi demonstrado que roedores parecem o modelo experimental mais eficiente para estudos de regulação e controle de desenvolvimento embrionário em nível molecular, tornando-se o modelo experimental para estudos pré-clínicos em humanos (BAUMANN et al., 2007).

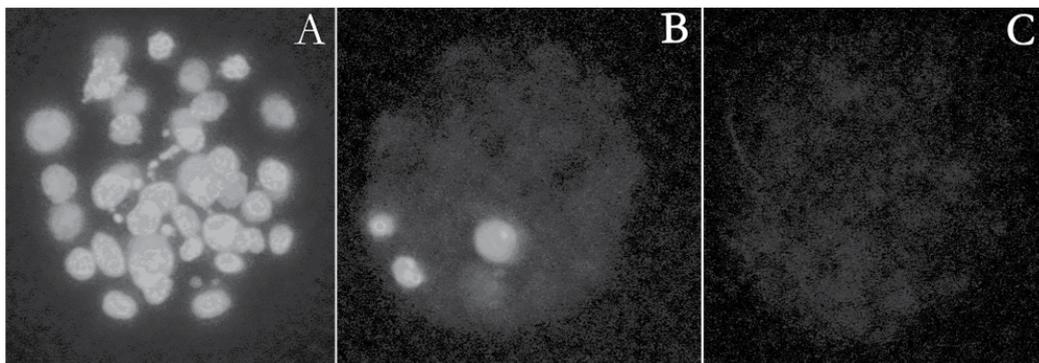


Figura 1: Blastocisto corado A- Coloração dos blastômeros corados pelo DAPI e visualizados no filtro 460nm. B- Células em apoptose identificadas pela fluoresceína através do filtro 520±20nm. C- Embrião em que a enzima do TUNEL foi omitida, não observando sinal fluorescente.

Quadro 1: Número total de estruturas coletadas (N) e embriões em diferentes estádios de desenvolvimento: mórulas (MOR), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (BL), blastocisto expandido (Bx) e estruturas degeneradas (DEG) após cultivo por 48 horas, de embriões de ratas Wistar superovuladas

| Repetição | Nº embriões coletados | Cinética de desenvolvimento (n) | | | Taxa de Blastocisto (%) |
|-----------|-----------------------|---------------------------------|----|----|-------------------------|
| | | Bi | BL | BX | |
| 1 | 78 | 21 | 15 | 27 | 80,76 (63/78) |
| 2 | 29 | 0 | 0 | 26 | 89,65 (26/29) |

Quadro 2: Número total de blastômeros, número de blastômeros apoptóticos e taxa de apoptose em embriões de ratos avaliados através da técnica de TUNEL.

| Repetição | Nº blastocistos fixados | Nº total de Blastômeros | Nº blastômeros Apoptóticos | Taxa de apoptose (%) |
|-----------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------|
| 1 | 21 | 29,5±3,75 a | 2,25±1,36 a | 8,03±5,74a |
| 2 | 13 | 28,0±5,85a | 3,1±1,97a | 12,8±11,61a |

Médias seguidas de letras iguais não diferiram significativamente entre si (P<0,05).

4 REFERÊNCIAS

- BAUMANN, C. G.; MORRIS, D. G.; SREENAN, J.M.; et al. The Quiet Embryo Hypothesis: Molecular Characteristics Favoring Viability. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 74, n. 10, p. 1345-1353, 2007.
- BYRNE, A. T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H. J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal Reproduction and Fertility**, Manchester, v. 117, n. 1, p. 97-105, 1999.

KADER, A.; AGARWAL, A.; ABDELRAZIK, H.; SHARMA, R. K.; et al. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. **Fertility and Sterility**, Torrance, v. 91, n. 5, p. 2087-2094, 2009.

KAGABU, S.; UMEZU, M. Variation with age in the numbers of ovulated ova and follicles of wistar-Imamichi adult rats superovulated with Ecg-Hcg. **Experimentation Animal**, Yamaguchi, v. 55, n. 1, p. 45-48, 2006.

KELKAR, R. L.; DHARMA, S. J.; NANDEDKAR, T. D. Expression of Fas and Fas ligand protein and mRNA in mouse oocytes and embryos. **Reproduction**, Mumbai, v. 126, n. 6, p. 791-799, 2003.

KON, H.; TOHEI, A.; HOKAO, R. et al. Estrous cycle stage-independent treatment of PMSG and hCG can induce superovulation in adult wistar-Imamichi rats. **Experimentation Animal**, Ibaraki, v. 54, n. 2, p. 185-187, 2005.

LEE, K.; HYSLOP, J. M.; NANASSY, L.; MACHATY, Z. Incidence of apoptosis in parthenogenetic porcine embryos generated by using protein kinase or protein synthesis inhibitors. **Animal Reproduction Science**, Salt Lake City, v. 112, n. 3, p. 261-272, 2009.

LI, H.J.; LIU, D.J.; CANG, M. et al. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, Hohhot, v. 114, n. 1-3, p. 89-98, 2009.

MAKAREVICH, A. V.; MARKKULA, M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. **Biology of Reproduction**, Nitra, v. 66, n. 2, p. 386-392, 2002.

STRINGFELLOW, D.; CROWE, M. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões**, Illinois, p. 112-113, 1998.

VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D. G. D.; KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine in vitro produced embryos of different developmental capacity. **Reproduction and Fertility**, Merelbeke, v. 133, n.4, p. 709-718, 2007.