

ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DE EMBRIÕES BOVINOS DA RAÇA NELORE

Adalgiza Pinto Neto
César Roberto Esper
José Monteiro da Silva Filho
Jéferson Ferreira da Fonseca
Marcelo Falci Mota
Heraldo Belisário
Wilson Saliba Pardini
Múcio Túlio Teixeira Alvim

PINTO-NETO¹, A.; ESPER², C.R.; SILVA-FILHO³, J.M.; FONSECA⁴, J.F.; MOTA⁵, M.F.; BELISÁRIO⁶, H.; PARDINI⁶, W.S.; ALVIM⁶, M.T.T. Análise ultra-estrutural de embriões bovinos da raça Nelore. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 4(2) : p. 189-194, 2001.

RESUMO: O conhecimento da ultra-estrutura de embriões bovinos, dentro das diferentes sub-espécies permite estabelecer características inerentes a cada uma delas, possibilitando o desenvolvimento de métodos eficientes para estocagem e conservação desses embriões. Diante disso, 17 embriões bovinos, da raça Nelore, foram preparados para análise ultra-estrutural, sob microscopia eletrônica. O processamento dos embriões foi realizado no Departamento de Reprodução Animal da UNESP – Jaboticabal. Para tanto, os embriões foram lavados sucessivas vezes para remoção do SFB, utilizado no meio de transporte, fixados em solução de glutaraldeído a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,15M e pH 7,6, desidratados em soluções com concentrações crescentes de álcool etílico, pré-incluídos, incluídos em cápsulas BEEM (*Better equipment for electron microscopy*), contendo resina EPON-812, submetidos em estufa à temperatura de 60°C por 72 horas, para polimerização, e seccionados. Devido às pequenas dimensões, os embriões inicialmente foram submetidos a secções semifinas (0,5 µm), para que a linha de corte propiciasse visualização do trofoblasto (TF) e massa celular interna (MCI). Após a triagem dos cortes, realizaram-se secções ultrafinas (60-70 nm), que foram colhidas em grades de cobre, coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas ao microscópio eletrônico. Dos embriões processados 64,71 % foram selecionados para análise ultra-estrutural. Observou-se que as células dos embriões analisados apresentavam-se semelhantes às descrições para blastocistos de bovinos *Bos taurus indicus*. O trofoblasto era formado por células alongadas que constituíam duas partes distintas; o trofoblasto mural, que delimitava a blastocel, e o trofoblasto polar, que recobria as células da massa celular interna. Suas células estavam intimamente ligadas por complexos juncionais, seguidos por desmossomos. As superfícies externas dessas células eram cobertas por microvilosidades proeminentes, com filamentos axiais, enquanto suas superfícies internas apresentavam-se lisas, com junções comunicantes (do tipo *gap*) com as células da MCI. Possuíam organelas usuais como mitocôndrias, lisossomos, ribossomos e poliribossomos, retículo endoplasmático liso e rugoso e complexo de Golgi com forma e número variados. Observaram-se também gotas lipídicas e numerosas

¹ Médica Veterinária, Mestre, Doutora, Pesquisadora do IPEAC e Professora de Fisiopatologia da Reprodução Medicina Veterinária – UNIPAR – Cx. Postal 106 - CEP 87502-210 – Umuarama-PR – Brasil. netoadalgiza@hotmail.com

² Médico Veterinário, Mestre, PhD, Professor e Pesquisador em Reprodução Animal - Curso de Medicina Veterinária – UNESP - Rodovia Prof. Paulo Castellane, s/n – 14870-000 – Jaboticabal-SP – Brasil.

³ Médico Veterinário, Mestre, Doutor, Professor de Fisiopatologia da Reprodução e Inseminação Artificial / Diretor da Escola de Veterinária – UFMG – Avenida Antônio Carlos, 6627 – 31270-000 – Belo Horizonte-MG – Brasil.

⁴ Médico Veterinário, Mestre, Doutorando em Zootecnia – UFV – Departamento de Zootecnia – Laboratório de Reprodução Animal – 36570-000 – Viçosa-MG – Brasil.

⁵ Médico Veterinário Autônomo, Especialista – Rua Saldanha Marinho, 378/304 – Maringá-PR – Brasil.

⁶ Médicos Veterinários – CENATTE (Centro de Assessoria Técnica e Transferência de Embriões) – Pedro Leopoldo-MG – Brasil

vesículas. As células da MCI eram cubiformes, ligadas umas as outras por junções desmossômicas, apresentando coloração mais clara que a das células do TF, e não apresentavam microvilosidades. As organelas citoplasmáticas eram semelhantes às do trofoblasto. Observaram-se, tanto nas células do TF quanto nas células da MCI, mitocôndrias do tipo *hooded* (cuculadas) descritas em ovócitos e caracterizadas por uma cavidade circular vazia.

PALAVRAS-CHAVE: bovino, embrião, ultra-estrutura, Nelore

ULTRA-STRUCTURAL ANALYSIS OF NELORE EMBRYOS

PINTO-NETO, A.; ESPER, C.R.; SILVA-FILHO, J.M.; FONSECA, J.F.; MOTA, M.F.; BELISÁRIO, H.; PARDINI, W.S.; ALVIM, M.T.T. Ultra-structural analysis of Nelore embryos. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 4(2) : p. 189-194, 2001.

ABSTRACT: The knowledge of the ultrastructure of bovine embryos in the different subspecies, allows identifying characteristics of the each one, permitting the development of efficient methods to storage and conservation of these embryos. Seventeen embryos of Nelore cows were processed to ultrastructural analysis, under electronic microscope, in the Department of Animal Reproduction of the UNESP – Campus of Jaboticabal. The embryos were washed several times to remove the bovine fetal serum of the transport medium. They were fixed in a solution of glutaraldehyde (1%) and sodium cacodilate buffer (0.15M and pH 7.6), dehydrated in solutions with increasing concentrations of ethylic alcohol, pre included and included in better equipment for electron microscopy containing EPON-812 resin, polymerized in stove at 60°C for 72 hours and sectioned. Due to their little size, the embryos were sectioned in semi thin sections (0.5 mm) permitting to visualize the trophoblast and inner cell mass (ICM). After this, the embryos were sectioned in ultra thin sections (60-70 nm) and fixed in copper grade, colored with uranyl acetate and lead citrate and observed under electronic microscope. Of the processed embryos 64.71% were selected to ultrastructural analysis. The cells of the analyzed embryos were similar to the bovine *Bos taurus indicus* blastocysts. The trophoblast was formed by extended cells that formed mural trophoblast that delimited the blastocoel and polar trophoblast that covered the cells of inner cell mass. The trophoblast cells were connected by junction complexes and desmosomes. The outer surface of trophoblast cells had microvillousities, with axial filaments. However, their inner surfaces were smooth with gap junctions with cells of ICM. These cells had usual organelles as mitochondria, lysosomes, ribosome and polyribosomes, smooth and rugous endoplasmic reticulum, several Golgi complexes, lipid globules and several vesicles. The cells of ICM had lighter color than the TF cells and it did not have microvillousities. The cytoplasmic organelles were similar to that observed in the TF. Both the ICM and the TF cells had hooded mitochondria.

KEY WORDS: bovine, embryo, ultrastructure, Nelore

ANÁLISIS ULTRA-ESTRUCTURAL DE EMBRIONES BOVINOS DE LA RAZA NELORE

PINTO-NETO, A.; ESPER, C.R.; SILVA-FILHO, J.M.; FONSECA, J.F.; MOTA, M.F.; BELISÁRIO, H.; PARDINI, W.S.; ALVIM, M.T.T. Análisis ultra-estructural de embriones bovinos de la raza Nelore. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 4(2) : p. 189-194, 2001.

RESUMEN: El conocimiento de la ultraestructura de embriones bovinos en las diferentes subespecies permite identificar características de cada una, permitiendo así el desarrollo de métodos eficaces al almacenamiento y conservación de estos embriones. Se procesaron diecisiete embriones de vacas de la raza Nelore al análisis ultraestructural, bajo microscopio electrónico, en la Sección de Reproducción Animal de la UNESP – Campus de Jaboticabal. Los embriones fueron lavados varias veces para quitar el suero fetal bovino del medio de transporte. Fueron fijados en una solución de glutaraldehído (1%) en cacodilato de

sódio (0,15M y pH 7,6), deshidratados en soluciones con concentraciones crecientes de alcohol etílico, incluso en cápsulas BEEM (*Better equipment for electron microscopy*) conteniendo resina EPON-812, polimerizados en estufa a 60°C por 72 horas y cortados. Debido a su pequeño tamaño, los embriones fueron cortados en secciones semi-finas (0,5 mm) permitiendo visualizar el trofoblasto (TF) y la masa celular interna (MCI). Después de seleccionados los cortes, fueron cortados en secciones ultra-finas (60-70 nm) y cogidos en una red de cobre, coloreados con acetato del uranilo y citrato de plomo y observados bajo el microscopio electrónico. De los embriones procesados se seleccionaron 64,71% para análisis ultraestructural. Las células de los embriones analizados eran similares a los blastocistos bovinos de *Bos taurus indicus*. El trofoblasto era formado por células extendidas que constituyen dos partes distintas; el trofoblasto mural, que delimitaba la blastocele, y el trofoblasto polar, que recubría las células MCI. Las células del TF eran conectadas por complejos de juntura y desmosomas. Las superficies externas del TF eran cubiertas por microvilosidades prominentes, con filamentos axiales. Sin embargo, sus superficies internas eran lisas, con junturas comunicantes (del tipo *gap*) a las células de MCI. Tenían las organelas usuales, como mitocondrias, lisosomas, ribosomas y polirribosomas, retículo endoplasmático liso y rugoso, varios complejos de Golgi, glóbulos del grasa y varias vesículas. Las células de MCI tenían color más claro que las células de TF y no tenían microvilosidades. Las organelas citoplasmáticas eran similares a las observadas en el TF. Tanto en las células de MCI cuanto de TF habían mitocondrias *hooded* (encapuchadas).

PALABRAS-CLAVE: bovino, embrión, ultraestructura, Nelore

Introdução

O conhecimento da ultra-estrutura embrionária bovina permite identificar particularidades do embrião entre sub espécies e raças diferentes, permitindo o desenvolvimento de metodologias de conservação, como resfriamento, congelamento e vitrificação, capazes de atender às exigências inerentes desses embriões, sem causar injúrias aos mesmos, como acontecem nos procedimentos convencionais comprovadas pelos baixos resultados observados.

ESPER (1997), comparando a ultra-estrutura de embriões taurinos e zebuínos, encontrou diferenças significativas entre eles, que incluem aumento no número e redução do volume das mitocôndrias, aumento do número de lisossomos e menor volume relativo ocupado por lípidos, em embriões zebuínos, quando comparados aos de taurinos.

Entre os animais zebuínos, os da raça Nelore têm merecido atenção especial devido ao importante papel social e econômico, que esses animais representam na pecuária de corte do país (VISINTIN, 1996). Diante disso, há a necessidade de estabelecer condições específicas de estocagem para embriões dessa raça, uma vez que os protocolos existentes foram desenvolvidos para embriões taurinos, não apresentando a mesma eficiência quando utilizados em embriões zebuínos.

Dessa forma, pretende-se com esse estudo descrever a ultra-estrutura de embriões bovinos da raça Nelore e contribuir para o conhecimento de suas particularidades, fornecendo subsídios adicionais para o desenvolvimento de metodologia específica de conservação desses embriões.

Material e Métodos

Foram colhidos, identificados e avaliados 17 embriões bovinos, obtidos de cinco vacas doadoras da raça Nelore, no CENATTE (Centro de Assessoria Técnica e Transferência de Embriões), em Pedro Leopoldo-MG, seguindo o protocolo proposto por PINTO-NETO *et al.* (2000).

Após avaliação, os embriões foram acondicionados em tubos de ensaio contendo solução tamponada fosfatada de Dulbecco acrescida de 10-20% de soro fetal bovino, e transportados (via aérea) até o Departamento de Reprodução Animal, da UNESP, Campus de Jaboticabal, onde foram processados para análise sob microscopia eletrônica. Para processamento dos embriões, seguiu-se o protocolo descrito por ESPER (1997). Antes de serem fixados, os embriões foram lavados sucessivas vezes em solução tamponada fosfatada de *Dulbecco* (PBS), a fim de se remover o soro fetal bovino utilizado no meio de transporte. Para a fixação, utilizou-se solução de glutaraldeído⁷ a 1%

em tampão cacodilato de sódio⁷ 0,15M e pH 7,6 por uma hora. Após fixação, foram lavados no mesmo tampão e submetidos à pós-fixação em tetróxido de ósmio⁷ a 1% por uma hora em temperatura de 4°C. Após três lavagens sucessivas em água bidestilada, realizou-se a desidratação em concentrações crescentes de etanol⁷ (50, 75, 90 e

100%), durante 15, 15, 15 e 30 minutos, respectivamente. A última desidratação, em álcool 100%, foi realizada duas vezes.

Os embriões foram embebidos em resina EPON-812⁷ e as pré-inclusões foram realizadas a partir de uma solução base, descrita na Tabela 01, seguindo três etapas, de acordo com a Tabela 02.

Tabela 1 - Composição da solução base para pré-inclusão de embriões bovinos. Jaboticabal - SP, 2000

Solução Mãe	Qualidade Total (mL)
EPON-812	50,00
<i>Dodecenylsuccinic Anhydride</i> (DDSA)	23,50
<i>Nadic Methyl Anhydride</i> (MNA)	26,50
<i>2,4,6 - Tri (dimethylaminomethyl) phenol</i> (DMP-30)	1,50

Tabela 2 - Etapas da pré-inclusão de embriões bovinos. Jaboticabal - SP, 2000

Inclusões	Componente		Duração (horas)
	Álcool	Solução base	
Primeira	¾ de etanol 100%	¼ de solução base	0,50
Segunda	½ de etanol 100%	½ de solução base	0,50
Terceira	--	100% de solução	12,00

Após as pré-inclusões, os embriões foram incluídos na solução base, por 72 horas, em estufa à temperatura de 60°C, e contidos em cápsulas de polietileno denominadas BEEM (*Better equipment for électron microscopy*), descritas por BOZZOLA & RUSSEL (1992), até completa polimerização.

Devido à pequena dimensão dos embriões (0,16mm) e a sua fragilidade, realizaram-se inicialmente secções semi-finas (0,5µm) com navalhas de vidro em ultra micrótomo⁸, a fim de triar os cortes sob microscopia óptica, selecionando-se os melhores para secções ultra-finas (60-70nm).

As secções semi-finas foram coradas com Azul de Toluidina, montadas em lâmina/lamínula e examinadas sob microscopia óptica⁹.

Secções ultra-finas foram obtidas com navalha de diamante e colhidas em grades de cobre (malha 200), coradas com Acetado de Uranila⁷ e Citrato de Chumbo⁷, de acordo com os protocolos de WATSON (1958) e VENABLE & COGGESHALL

(1965). Finalmente, os embriões foram seccionados em toda sua extensão, e as secções ultra-finas, após serem coradas, foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão¹⁰, utilizando-se um aumento de 15.000 vezes e cópias ampliadas em 1,5 vezes, resultando em um aumento final de 22.500 vezes.

Resultados e Discussão

Dos 17 embriões destinados à microscopia eletrônica, 82,35% (14/17) eram Grau I e o restante, 17,65% (03/17) Grau II. Desses 11,77% (02/17) estavam em estágio de mórula, 23,53% (04/17) em blastocisto inicial, 29,41% (05/17) em blastocisto e 35,30% (06/17) em blastocisto expandido. Embora tenha sido utilizado um pequeno número de embriões, esses resultados confirmam os dados descritos por FONSECA *et al.* (2001) e PINTO-NETO *et al.* (2000), ao relatarem a predominância de estádios adiantados de desenvolvimento, para embriões de

⁷ Laboratório Sigma

⁸ Reicher OM - U₂, Áustria

⁹ Zeiss, West Germany

¹⁰ Jeol - JEM - 100C, Japan

raças zebuínas, coletados no sétimo dia após a inseminação das doadoras.

As secções finas dos embriões processados para microscopia eletrônica possibilitaram que as linhas de corte abrangessem as células do trofoblasto e da massa celular interna.

Foram selecionados para secções ultra-finas 64,71% (11/17) dos embriões processados, após serem submetidos à triagem através de secções semi-finas. Esse resultado foi superior ao descrito por DE BEM (1982), ao relatar que a cada dois blastocistos processados para microscopia eletrônica, um era analisável. Também foi superior ao encontrado por ESPER (1986) e ESPER (1997), que obtiveram rendimento médio de 45,50% e 29,40%, respectivamente. Os resultados superiores desse trabalho talvez possam ser explicados pelo maior número de embriões processados em relação aos trabalhos citados anteriormente, bem como pelo aprimoramento da técnica (ESPER, 1986; ESPER, 1997).

As células embrionárias apresentaram-se semelhantes às descritas por ESPER (1997), para blastocistos bovinos da mesma sub-espécie *Bos taurus indicus*. Assim, o trofoblasto era formado por células alongadas que constituíam duas partes distintas: o trofoblasto mural, que delimitava a blastocele, e o trofoblasto polar, que recobria a massa celular interna. Suas

células estavam intimamente ligadas por complexos juncionais seguidos por variado número de desmossomos. As superfícies externas dessas células eram cobertas por proeminentes microvilosidades, com filamentos axiais, enquanto suas superfícies internas apresentavam-se lisas, apresentando junções comunicantes (tipo gap) com as células da massa celular interna, quando do trofoblasto polar. Possuíam organelas usuais como mitocôndrias, lisossomos, ribossomos e polirribossomos, retículo endoplasmático (liso e rugoso) e complexo de Golgi, com forma e número variados. Observou-se também gotas lipídicas e numerosas vesículas (Figura 01). As células da massa celular interna possuíam forma cuboidal, ligadas umas às outras por junções desmossômicas, apresentando coloração mais clara que a das células do trofoblasto e não apresentavam microvilosidades.

As organelas citoplasmáticas eram semelhantes as do trofoblasto (Figura 02).

Observaram-se, tanto nas células do trofoblasto quanto nas células da massa celular interna, mitocôndrias do tipo *hooded*, descritas em ovócitos bovinos por SENGER & SAACKE (1970) *apud* FLEMING & SAACKE (1972), sendo caracterizadas por uma cavidade circular vazia, de dimensões variáveis. Esse tipo de mitocôndria também foi encontrado por ESPER (1997) em embriões bovinos na fase de blastocisto.

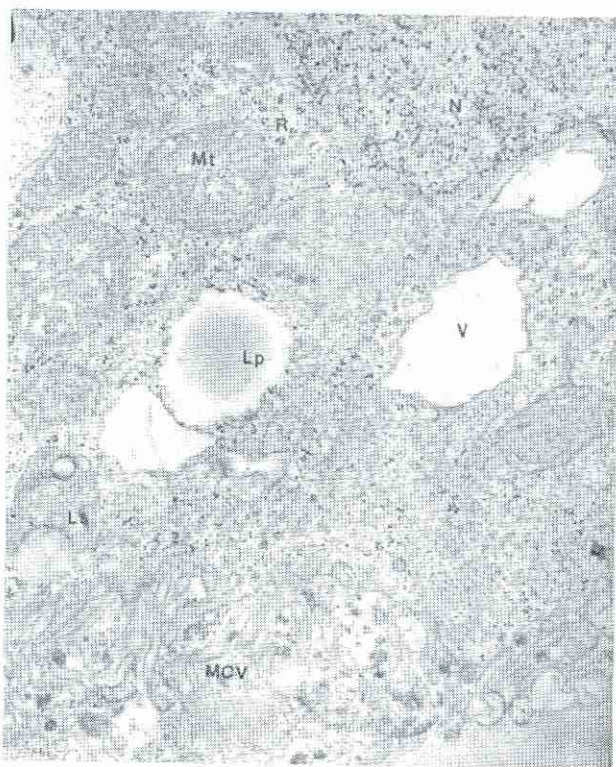


Figura 01 - Eletronmicrografia de células do trofoblasto de embrião bovino da raça Nelore (22.500 X). Lp: lípide; Ls: lisossomo; MCV: microvilosidades; Mt: mitocôndria normal; N: núcleo; R: ribossomos e polirribossomos; V: vesícula

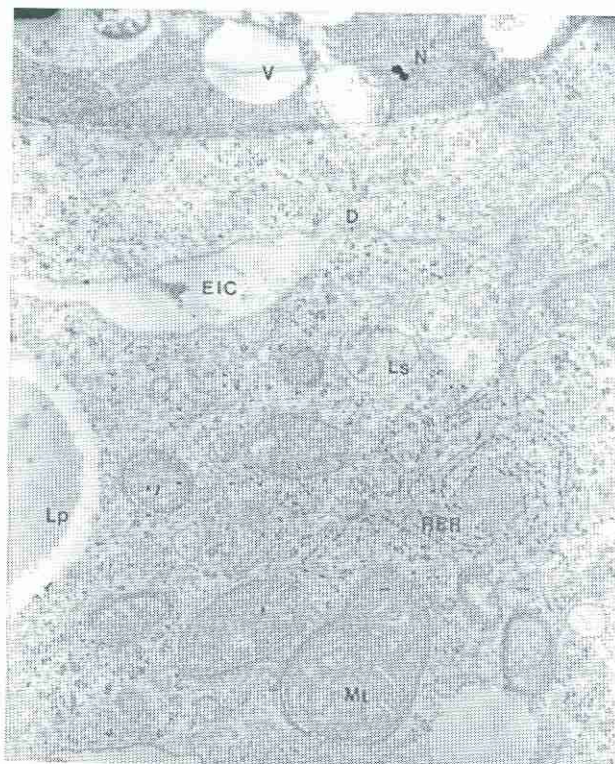


Figura 02 - Eletronmicrografia de células da massa celular interna de embriões bovinos da raça Nelore (22.500 X). D: desmossomo; EIC espaço inter-celular; Lp: lípide; Ls: lisossomo; Mt: mitocôndria normal; N: núcleo; RER: retículo endoplasmático rugoso; V: vesícula

Conclusão

A semelhança na ultra-estrutura dos embriões da raça Nelore com os demais da subespécie *Bos taurus indicus*, enfatiza a necessidade do desenvolvimento de protocolos de conservação específicos para embriões zebuínos, uma vez que os mesmos apresentam diferenças ultra-estruturais significativas quando comparadas às provenientes de embriões *Bos taurus taurus*, podendo auxiliar a justificativa relativa aos baixos resultados obtidos, quando embriões zebuínos são submetidos aos protocolos de congelação existentes.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do CENATTE, do Laboratório de Reprodução Animal e do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP, Campus de Jaboticabal, da Fazenda Santo Antônio Caetano da Cerca Grande, em Pedro Leopoldo e da FAPEMIG (Projeto de CAG 2206/97), sem o qual esse estudo não teria sido concluído.

Referências

- BOZZOLA, J.J. & RUSSEL, S.D. Specimen preparation for transmission electron microscopy. In: BOZZOLA, J.J. & RUSSEL, S.D. *Electron microscopy, principles and techniques for biologists*. London: Jones and Bartlett, 1992. p.16-38.
- DE BEM, A.R. Effect de la superovulation et de la congelation sur lê blastocyste de vache. Etude ultrastructural. Paris, 1982. 74f. Tese (Doutorado) - L'Universite Pierre & Marie Curie.
- PINTO-NETO, ESPER, SILVA-FILHO *et al.* ESPER, C.R. Avaliação dos efeitos da congelação sobre blastocistos bovinos. Ribeirão Preto, 1986. 120f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- ESPER, C.R. Ultra-estrutura comparativa de embriões bovinos. Jaboticabal, 1997. 84f. Tese (Livre Docência) - Departamento de Reprodução Animal, Universidade Estadual de São Paulo.
- FLEMING, W.N. & SAACKE, R.G. Fine structure of the bovine oocyte from the nature Graafian follicle. *J. Reprod. Fert.*, Cambridge, v.29, p.203-213, 1972.
- FONSECA, J.F.; SILVA-FILHO, J.M.; PINTO-NETO, A.; PALHARES, M.S. Estádio de desenvolvimento avançado em zebuínos. *Arq. Bras. Méd. Vet. e Zoot.*, Belo Horizonte, v.-, p.-, 2001. [No Prelo]
- PINTO-NETO, A.; SILVA-FILHO, J.M.; FONSECA, J.F.; MOTA, M.F.; BELISÁRIO, H.; PARDINI, W.S.; ALVIM, M.T.T. Desempenho de vacas doadoras da raça Nelore, em programa de transferência de embriões. *Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, v.3, n.2, p.167-173, ago./dez. 2000.
- VENABLE, J.H & COGGESHALL, R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cel. Biol.*, New York, v.25, p.407, 1965.
- VISINTIN, J.A. Criopreservação de embriões *Bos taurus indicus*. *Arq. Fac. Vet. da UFRGS*, Porto Alegre, v.24, p.82-97, 1996.
- WATSON, M.L. Staining of tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem.*, New York, v.4, p.475-478, 1958.

Recebido para publicação em 14/05/01.
 Received for publication on 14 May 2001.
 Recibido para publicación en 14/05/01.
 Aceito para publicação em 30/06/01.
 Accepted for publication on 30 June 2001.
 Acepto para publicación en 30/06/01.