

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Etapas iniciais do desenvolvimento embrionário em
Calomys callosus (Rodentia-Cricetidae)**

Márcio José Ferreira

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG
Dezembro - 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Etapas iniciais do desenvolvimento embrionário em
Calomys callosus **(Rodentia-Cricetidae)**

Márcio José Ferreira

Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal
de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG
Dezembro - 2004

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais,

Antonio e Antonia, que me proporcionaram vencer mais esta etapa de minha vida;

Às minhas irmãs

Maria Alesandra e Aliandre que sempre estiveram ao meu lado nos momentos de desespero e dúvida;

Aos amigos e colegas que sempre estiveram presentes durante esta longa jornada;

- Bellisa de Freitas Barbosa
- Angélica de Oliveira Gomes

Aos funcionários do laboratório de Histologia que me apoiaram e me auxiliaram nos meus experimentos:

- Helgio Heinisch Werneck
- Juscélia Marques Alemar

À minha orientadora:

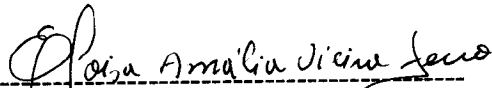
Eloísa Amália Vieira Ferro que muito me ajudou durante a realização desta monografia e por ter me ensinado a dizer as coisas certas no momento certo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

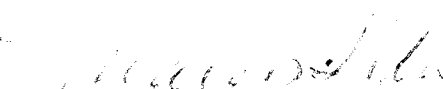
**Etapas iniciais do desenvolvimento embrionário em
Calomys callosus (Rodentia-Cricetidae)**

Márcio José Ferreira

Aprovado pela Banca Examinadora em 10/12/04 Nota 100,0


Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro
Nato da banca examinadora


Dr. Marcelo Emilio Beletti
Examinador


Dr. Marcos Silva
Examinador

Uberlândia, 10 de dezembro de 2004

Resumo

A fertilização tem início com o contato entre o espermatozóide e o ovócito e finaliza com a fusão do material genético contido nestes gametas. *Calomys callosus* tem importância por ser reservatório natural de *Trypanosoma cruzi*, transmissor da febre hemorrágica argentina e portar doenças infecciosas como esquistossomose e leishmaniose. Foram sacrificadas fêmeas no 1º, 2º, 3º e 4º dias de gestação com coletas as 9 - 15 - 21 - 3h fazendo estudos de microscopia de luz e análise morfométrica dos embriões. Os fragmentos contendo as tubas uterinas foram dissecados e fixados em formol 10% e tampão PBS pH 7,2 e processados para a observação ao microscópio de luz. Embriões nos estágios de pré-fusão dos pronúcleos, zigoto, dois blastômeros, mórula e blastocisto foram encontrados. Os resultados mostraram que: a fase de óvulo foi observada na manhã do primeiro dia de gestação, a fase de zigoto na tarde do primeiro dia, a fase de dois blastômeros na noite do primeiro dia, a fase de mórula na tarde do terceiro dia e a fase de blastocisto na manhã do quarto dia de gestação.

Palavras-chave: Embrião, Fertilização, *Calomys callosus*.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1. - Espermatogênese	2
1.1.1 - Espermatozóide	3
1.1.2 - Capacitação espermática e reação acrossômica	4
1.2. - Ovogênese	5
1.2.1 - Ovócito	6
1.3. - Fecundação	7
1.3.1. - Reconhecimento entre espermatozóide e óvulo	8
1.3.2. - Bloqueio a poliespermia e ativação metabólica do óvulo	10
1.4. - Início da clivagem até o estágio de mórula	12
1.4.1. - Estágio de blastocisto	12
1.5. - <i>Calomys callosus</i>	13
2 - OBJETIVOS	15
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. - Espécimes	16
3.3. - Acasalamento	16
3.3. - Coleta do material	17
3.4. - Fixação e processamento do material para microscopia de luz	17
3.5. - Procedimentos para análise morfométrica do material	18
4 - RESULTADOS	19
4.1. - Óvulo	19
4.2. - Estágio de zigoto	20
4.3. - Estágio de dois blastômeros	20
4.4. - Estágio de mórula	21
4.5. - Estágio de blastocisto	21
4.6. - Espessura da zona pelúcida e diâmetro embrionário	21

5 - DISCUSSÃO	23
6 - CONCLUSÕES	28
DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	29
TABELA 1 - Análise morfométrica dos estágios embrionários	36
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 - INTRODUÇÃO

Uma característica inerente a todos os animais é o potencial de reprodução. Reproduzir significa dar continuidade à vida por meio da geração de novos indivíduos. A formação de um novo organismo está diretamente relacionada com o DNA que possui as bases moleculares para originar os mais diversos tipos de organismos já encontrados (GILBERT, 2002).

Os diversos tipos de reprodução podem ser reunidos em dois grandes grupos: 1- reprodução assexuada onde os indivíduos formados são geneticamente idênticos aos ancestrais e, 2- reprodução sexuada onde os descendentes, apesar de serem semelhantes aos pais, não são geneticamente idênticos a eles (GILBERT, 2002).

A reprodução animal está intimamente relacionada com a produção de células reprodutoras. A formação destas células consiste em um processo denominado gametogênese e envolve uma série de divisões celulares (meiose) que resulta na formação do espermatozóide e do ovócito. A gametogênese geralmente não é concluída até que o organismo esteja fisicamente maduro. No macho a gametogênese é denominada de espermatogênese enquanto que na fêmea é chamada ovogênese. Estes processos vão formar o espermatozóide e o ovócito, respectivamente (GILBERT, 2002).

A formação do novo organismo começa quando o gameta masculino, ou espermatozóide, se une a um gameta feminino, ou ovócito, para formar o zigoto ou célula-ovo. O material genético do espermatozóide (pronúcleo masculino) e do ovócito (pronúcleo feminino) fundem-se e preparam-se para a primeira clivagem do zigoto (MYLES, 1995). A fecundação se concretiza logo após a fusão dos pronúcleos (GILBERT, 2002).

1.1. - Espermatogênese

O espermatozóide é formado durante a espermatogênese, um elaborado processo de diferenciação celular que ocorre no interior dos túbulos seminíferos presentes nos testículos (CARVALHO et. Al., 2002). Na espécie humana a gametogênese inicia-se ainda na vida embrionária, entre a 5ª e 6ª semana, quando as células germinativas se dividem rapidamente para gerar as espermatogônias e ovogônias (LIN et al., 2002). Estas células permanecem em estado de latência até a puberdade quando, sob o efeito das gonadotropinas hipofisárias, dão início ao processo de amadurecimento com a formação dos espermatozóides (HERMO e CLEMONT, 1995).

Pela ação dos hormônios hipofisários, as espermatogônias são ativadas e sofrem mitose conservando a linhagem de células espermatogênicas e formando células denominadas espermatócitos I. O espermatócito I sofre divisão meiótica originando duas células haplóides chamadas espermatócitos II. Cada espermatócito II passa pela segunda divisão meiótica formando células menores conhecidas por espermátides. Estas células agora sofrem modificações que resultam em redução do seu citoplasma e compactação da cromatina formando os espermatozóides que são lançados na luz dos túbulos seminíferos (MOORE & PERSAUD, 2000).

1.1.1 - Espermatozóide

Até o século XIX o papel desempenhado pelo espermatozóide ainda não havia sido desvendado. LEEUWENHOEK (1685) chegou a afirmar que os espermatozóides eram parasitas que viviam no sêmen humano e por isso a denominação *espermatozoa* – “animais do esperma”.

Com o surgimento da teoria celular e de melhores lentes pôde-se descobrir que os espermatozóides não eram parasitas. KOLLIKER (1840) postulou a hipótese de que os espermatozóides eram formados nos testículos dos machos adultos. A importância do espermatozóide na reprodução foi confirmada por HERTWING and HERMAN (1876), quando demonstraram a penetração do espermatozóide no óvulo e a união dos núcleos destas células. Para isso utilizaram uma suspensão de ovócitos e espermatozóides de uma espécie de ouriço-do-mar (GILBERT, 2002).

Os espermatozóides são células especializadas para fertilizar o ovócito e apresentam três partes: 1- cabeça, onde se localiza o material genético e o acrossoma; 2- peça intermediária, uma região rica em mitocôndrias e que fornece energia aos movimentos flagelares; 3- Cauda, que é formada pelo flagelo e que provoca a motilidade espermática. O acrossoma é derivado do complexo de Golgi e possui enzimas que auxiliam na penetração do espermatozóide durante a fertilização (AMANN et al., 1995).

Alguns trabalhos que envolvem fertilização “in-vitro” (IVF) demonstram um efeito significativo do espermatozóide na morfologia do embrião e na clivagem dos blastômeros (PARINAUD et al., 1993; RON-EL et al., 1991). Além de fornecer metade do patrimônio genético, o espermatozóide também contribui para a formação do centrôssomo. Durante o desenvolvimento do embrião, o centrôssomo forma os pólos mitóticos, por isso regulam a primeira e as subseqüentes divisões celulares. ASCH e colaboradores (1995) demonstraram que defeitos no centrôssomo podem levar a desordens na fertilização e no desenvolvimento

embrionário. De acordo com SALUMENTS e colaboradores (2002) a morfologia do embrião, dois dias após a inseminação, é determinada pelas propriedades do ovócito, enquanto a clivagem dos blastômeros é influenciada pelo espermatozóide e o ovócito.

Alguns fatores podem causar sérios efeitos na qualidade dos espermatozóides. Estes efeitos deixam os espermatozóides praticamente inviáveis no momento da fertilização. Alguns estudos mostram que o hábito de fumar tem um efeito prejudicial na qualidade do esperma e, mais significativamente na concentração, motilidade e morfologia (STILLMAN et al., 1986; SOFIKITIS et al., 1995; VINE et al., 1996; MERINO et al., 1998; MAK et al., 2000). A fumaça do cigarro tem sido relacionada com o mau funcionamento do esperma (SOFIKITIS et al., 1995; CLOSE et al., 1990).

1.1.2 - Capacitação espermática e reação acrossômica

Os espermatozóides necessitam sofrer modificações funcionais e estruturais para serem capazes de fertilizar os ovócitos. O conjunto destas transformações é definido como capacitação espermática (AUSTIN, 1952).

Durante a capacitação do espermatozóide foi verificada em muitas espécies, uma diminuição do colesterol da membrana plasmática do espermatozóide (DAVIS, 1981) e a perda de proteínas e carboidratos (LOPEZ, et al., 1985; WILSON e OLIPHANT, 1987; POIRIER e JACKSON, 1981). É possível que estas mudanças nos lipídios da membrana sejam responsáveis pela maior mobilidade das proteínas da membrana e que as porções perdidas durante a capacitação estejam bloqueando as proteínas que se ligam à zona pelúcida.

A capacitação também depende de alterações da permeabilidade da membrana ligadas ao transporte de íons cálcio (MYLES, 1995). "In vivo", o tempo gasto pelo espermatozóide no útero e nos ovidutos (tubas uterinas) certamente é necessário para a capacitação, e tanto "in vivo" como "in-vitro", uma variedade de substâncias, incluindo o fluido folicular (YANAGIMACHI,

1970), fatores uterinos e das tubas uterinas (BARROS, 1968), fatores das células do *cumulus ooforus* (GWATKIN et al., 1972) e catecolaminas (CORNETT and MEIZEL, 1978) estão envolvidos na capacitação e na reação acrossômica. Dessa forma, os espermatozóides recém ejaculados são incapazes de fecundar o ovócito sem que tenham permanecido por um certo tempo no trato reprodutivo da fêmea, ou em meio de cultura que simule este microambiente.

Os espermatozóides capacitados poderão agora sofrer reação acrossômica. Esta reação é caracterizada pela fusão entre a membrana plasmática do espermatozóide e a membrana acrossomal externa, resultando na liberação de enzimas do conteúdo acrossômico. As enzimas contidas no acrossômo vão abrir caminho para o espermatozóide penetrar no ovócito e realizar a fecundação.

A reação acrossômica acontece a partir do momento em que há um livre contato entre o espermatozóide e o ovócito. Sendo assim, os espermatozóides necessitam reagir com componentes dos ovócitos (células do *cumulus ooforus*, fluido folicular, zona pelúcida) para completar a reação acrossômica (MYLES, 1995). Entretanto SILVA E FERRO (2003) encontraram espermatozóide de *Calomys callosus* em processo de reação acrossômica sem contato com o ovócito.

1.2. - Ovogênese

Dependendo da espécie, os ovócitos são previamente formados ainda na vida embrionária durante a ovogênese. Porém, os ovócitos de carnívoros e lagomorfos são formados somente após o nascimento do animal (BANKS, 1992).

Por volta da 5ª e 6ª semanas, na espécie humana, as células germinativas dividem-se rapidamente para formar as ovogônias (LIN et al., 2002). As ovogônias, por sua vez, sofrem divisão mitótica e aumentam de tamanho. Além disso, também recebem uma camada externa de células foliculares, passando a se chamar de ovócitos primários. Todo esse evento,

dependendo da espécie, acontece antes que o nascimento ocorra de modo que os ovócitos primários iniciam a prófase da primeira divisão meiótica até o nascimento (MOORE & PERSAUD, 2000). Sendo assim, após o nascimento os indivíduos machos permanecem com sua linhagem de células germinativas (espermatozônias), ao passo que as fêmeas vão ter ovogônias apenas no período embrionário.

Durante a ovogênese, as células foliculares ou da granulosa representam uma peça importante na nutrição do ovócito (RAVEN, 1961). Células da granulosa constituem-se de células do próprio ovário que vão circundar o ovócito primário. ANDERSON E BEAMS (1960) sugeriram que, no folículo primário, o material nutritivo sintetizado pelas células da granulosa chegam ao ovócito por difusão ao longo da zona pelúcida. Em coelhos a formação do folículo e a elaboração da zona pelúcida começam no final da segunda semana depois do nascimento (GONDOS & ZAMBONI, 1967).

Por ocasião da puberdade alguns folículos primários se tornarão maduros durante o ciclo estral/menstrual e a maturação é controlada pela ação de hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

1.2.1 - Ovócito

O ovócito, em termos de volume, é bem maior que o espermatozóide. Esta diferença de tamanho é devido ao acúmulo de nutrientes, vitelo, que é necessário para o crescimento e desenvolvimento inicial.

No geral o vitelo é constituído por proteínas, lipídios, além de RNA e ribossomos. O citoplasma do ovócito é envolvido pela membrana plasmática que regula o fluxo de alguns íons e se funde a membrana do espermatozóide durante a fecundação. Próximo à membrana plasmática, na região cortical, existem alguns grânulos corticais que são vesículas membranosas derivadas do Golgi que contem enzimas proteolíticas (GILBERT, 2002).

Circundando todo o ovócito, encontra-se o envoltório vitelínico que nos mamíferos é chamada de zona pelúcida. Este envoltório é essencial para a ligação espécie-específica do espermatozóide. No ovócito quase maduro, as células da granulosa vão formar a *corona radiata* e o *cumulus ooforus*. A *corona radiata* é formada por células mais aderidas à zona pelúcida e o *cumulus oophorus* por células mais distantes e difusas da zona pelúcida e do ovócito (GILBERT, 2002).

Alguns estudos indicam que, na espécie humana, o número de ovócitos formados durante a vida fetal diminui rapidamente durante o período reprodutivo da mulher (BLOCK, 1952). Além disso, a qualidade do ovócito diminui com o aumento da idade e defeitos cromossômicos, como a aneuploidia, é mais freqüente em embriões de mulheres com idade avançada (MUNNE et al., 1995).

1.3. - Fecundação

A fecundação ou fertilização é um processo que se inicia com o contato entre o espermatozóide e o ovócito e finaliza com a fusão do material genético contido nestes gametas. O momento em que antecede a fecundação é caracterizado por uma série de eventos que culminam para a fusão dos gametas. Os principais eventos que ocorrem durante a fecundação são: 1- Contato e reconhecimento entre o espermatozóide e ovócito; 2- regulação da entrada do espermatozóide no ovócito; 3- fusão do material genético do espermatozóide e do ovócito; 4- ativação do metabolismo do ovócito para iniciar o desenvolvimento (GILBERT, 2002).

Os mamíferos possuem fecundação interna e o processo de fecundação foi adaptado a este ambiente. Além disso, ao contrário do que acontece com as aves e os répteis, a maioria dos os mamíferos mantêm a prole no interior do seu organismo até o nascimento. Deste modo, o trato reprodutivo da fêmea dos mamíferos tem fundamental importância na fecundação, principalmente no que se refere à capacitação dos espermatozóides.

1.3.1 - Reconhecimento entre espermatozóide e ovócito

Para atingir o ovócito o espermatozóide precisa antes passar pela camada de células foliculares e pela zona pelúcida. Em algumas espécies as células foliculares não estão presentes no momento da fecundação, mas elas não constituem barreira para o espermatozóide mesmo quando presentes (TALBOT et al., 1985).

O contato entre o espermatozóide e o ovócito se dá especificamente através de ligantes localizados na membrana citoplasmática do espermatozóide e receptores presentes na zona pelúcida do ovócito (GILBERT, 2002).

Nos mamíferos, assim como em alguns animais marinhos, a zona pelúcida é que faz o controle da ligação do espermatozóide ao ovócito. A zona pelúcida é composta por um complexo glicoproteico constituída pela ZP1, ZP2 e ZP3. Destas três glicoproteínas a ZP3 é a que desempenha maior importância em mamíferos, atuando como receptor para o reconhecimento do espermatozóide e desencadeando o início da reação acrossômica (GIBERT, 2002).

Em ouriço-do-mar os receptores que fazem o reconhecimento do espermatozóide, no envoltório vitelínico, são proteínas denominadas Bindinas. A ZP3, nos mamíferos, é importante também no reconhecimento espécie-específico. BARROS (1968), mostrou que espermatozóides de hamsters não podem penetrar a zona pelúcida dos ovócitos de ratos ou camundongos e que espermatozóides humanos não se ligam nem mesmo a zona pelúcida dos ovócitos de animais não primatas.

O mecanismo molecular pelo qual a zona pelúcida e o espermatozóide se reconhecem está sendo investigado. A hipótese mais provável para esta ligação é que há um conjunto de proteínas na membrana do espermatozóide capazes de reconhecer um carboidrato específico (galactose) e regiões da ZP3 na zona pelúcida (WASSARMAN, 1987; SALING, 1989).

Com relação aos ligantes presentes na membrana do espermatozóide, acredita-se são peptídeos que fazem ligação com os componentes da zona pelúcida ou do envoltório vitelínico. A reação acrossômica é iniciada no momento em que ocorre a ligação entre os peptídeos de membrana do espermatozóide e os receptores contidos no envoltório do ovócito (GILBERT, 2002).

BEIL & WASSARMAN (1990) identificaram uma proteína de 56 kDa em espermatozóide de camundongo que possui a propriedade de ligar-se a proteína 3 (ZP3) purificada da zona pelúcida. Na membrana plasmática do espermatozóide, sobre o capuz acrossômico, existe a proteína Fertilin (PRIMAKOFF et al., 1987; MYLES, 1993), que é capaz de interagir com integrinas presentes na membrana plasmática do ovócito, permitindo a ligação dos dois gametas (FUSI et al., 1993; ALMEIDA et al., 1995).

A reação acrossômica consiste na liberação das enzimas contidas no acrossoma, as quais têm a função de formar uma passagem para o espermatozóide, através das células do *cumulus ooforus* e da zona pelúcida, até a membrana citoplasmática do ovócito (CARVALHO et al., 2002). O caminho aberto pelas enzimas do acrossoma é chamado de cone de fecundação. A fusão da membrana plasmática do espermatozóide e do ovócito permite a entrada definitiva do espermatozóide no ovócito, consistindo na fecundação. O núcleo e a cauda do espermatozóide penetram no citoplasma do ovócito, bem como um par de centríolos (GILBERT, 2002).

Após a fecundação ocorre a reação cortical, onde as enzimas dos grânulos corticais são lançadas no espaço perivitelínico. As enzimas reagem com a zona pelúcida e a torna impermeável aos demais espermatozóides, agindo como um efetivo bloqueio a poliespermia (GWATKIN et al., 1973; INOUE & WOLF, 1975).

1.3.2 - Bloqueio a poliespermia e ativação metabólica do óvulo

A fecundação é normal quando apenas um espermatozóide consegue penetrar no ovócito (Monoespermia), levando a uma fusão posterior dos pronúcleos masculino e feminino.

Ocasionalmente mais de um espermatozóide pode penetrar no ovócito (Poliespermia). Isto altera o número normal de cromossomos do zigoto e modifica os padrões de clivagem (GILBERT, 2002).

A fim de impedir a entrada de mais de um espermatozóide no ovócito, em muitas espécies animais, ocorre dois mecanismos de prevenção a poliespermia: Um bloqueio rápido ou elétrico e um bloqueio lento ou químico (GILBERT, 2002).

O bloqueio rápido consiste numa inversão da polaridade elétrica na membrana do ovócito. Isto acontece devido a uma diferença nas concentrações dos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) dentro e fora do ovócito. A fusão da membrana plasmática do espermatozóide com a membrana plasmática do ovócito causa alteração na membrana do ovócito e resulta em bloqueio a poliespermia (WOLF, 1978). Os grânulos corticais se fundem com a membrana do ovócito logo após a penetração do espermatozóide, liberando o seu conteúdo enzimático no espaço perivitelínico. Este mecanismo dá origem ao bloqueio lento a poliespermia (GILBERT, 2002).

As enzimas liberadas durante a reação cortical provocam modificações na zona pelúcida, levando a inativação das glicoproteínas ZP1, ZP2 e ZP3. Estas alterações denominadas “reações zonais” impedem, na maioria das espécies, a penetração de outro espermatozóide no ovócito (CARVALHO et al., 2002).

FLORMAN & WASSARMAN (1985) mostraram que os grânulos corticais dos ovócitos de camundongos contêm uma enzima que corta o açúcar terminal da ZP3, liberando assim espermatozoides ligados à zona pelúcida e prevenindo a ligação de outros espermatozoides.

Em fertilizações “in-vitro” as anormalidades são freqüentes como a poliespermia (SAEKI et al., 1991; CHIAN et al., 1992) e a diminuição do potencial do ovócito, provocado por enzimas hidrolíticas liberadas pelos espermatozóides. Isso acontece quando os ovócitos são incubados com grande número de espermatozóides em pequeno volume (REHMAN et al., 1994).

O contato entre os gametas induz ainda a ativação do óvulo com a retomada da segunda divisão meiótica que havia sido suspensa na metáfase II. Logo após, o material genético do espermatozóide (pronúcleo masculino) e do ovócito (pronúcleo feminino) fundem-se e preparam-se para a primeira clivagem da célula-ovo ou zigoto (MYLES et al., 1995). A fusão dos gametas, seguido pela ativação da meiose interrompida e a fusão dos pró-núcleos masculino e feminino, constitui uma fertilização normal (THADANI, 1980).

Os eventos mais importantes para a verdadeira ativação do óvulo estão diretamente relacionada com a liberação de íons cálcio pelo retículo endoplasmático e pela elevação do pH citoplasmático do ovócito (GILBERT, 2002).

As reações bioquímicas para a ativação do ovócito começam quando o espermatozóide se liga à membrana do ovócito. A proteína G da membrana plasmática do ovócito é ativada que, por sua vez, ativa a enzima Fosfolipase C. A Fosfolipase C cliva o Fosfatidilinositol 4,5-Bifosfato em Diacilglicerol e Inositol 1,4,5-Trifosfato (IP_3). O IP_3 liberado se liga a uma proteína no retículo endoplasmático que libera íons cálcio estocados (FURUICHI et al., 1989; FERRIS et al., 1989). Já o Diacilglicerol ativa outra enzima de membrana, a Proteína Quinase C que ativa a bomba de Na^+/H^+ que troca íons sódio por íons hidrogênio (SWANN e WHITAKER, 1985, SHEN e BURGART, 1986) que aumenta o pH do citoplasma.

1.4. - Início da clivagem até o estágio de mórula

A clivagem consiste em uma série de divisões mitóticas, onde o enorme volume do citoplasma do zigoto é dividido em numerosas células nucleadas menores. Estas células da fase de clivagem são chamadas de blastômeros.

Logo após a fusão dos pronúcleos, o DNA começa a replicar e as proteínas começam a ser sintetizadas. O zigoto está agora se preparando para o desenvolvimento de um novo organismo e a coordenação do plano de clivagem são mediadas, provavelmente, pelos microtúbulos do espermatozóide (MANES et al., 1978; GERHART et al., 1981; ELINSON, 1985).

Em grande parte das espécies não há aumento no volume do embrião durante a clivagem. Isto difere da maioria dos casos de proliferação celular onde há um período de crescimento celular entre as mitoses. Durante a clivagem o zigoto é dividido ao meio, depois em quartos, em oitavos e assim por diante. Em alguns casos a clivagem pode ter um número ímpar de blastômeros, como ocorre quando o embrião atinge a fase de três blastômeros (GILBERT, 2002).

A fase de mórula será alcançada quando o embrião possuir aproximadamente 16 blastômeros, dependendo da espécie. A partir de então, surge uma cavidade no maciço celular denominada blastocelo, o que caracteriza a fase de blástula. Por causa desta cavidade as células são comprimidas em um dos pólos do embrião e este aglomerado celular passa a se chamar massa celular interna (GILBERT, 2002).

1.4.1 - Estágio de blastocisto

Na fase de blastocisto o embrião já está pronto para se implantar no útero, uma vez que a zona pelúcida foi perdida. Um conjunto de células achatadas que revestem a massa celular

interna e a blastocle é chamado de trofoblasto. Este é restrito aos mamíferos, e tem a função de fixar o embrião à mucosa uterina e promover a fagocitose de elementos maternos em fases que antecedem a formação da placenta. Nas fases subseqüentes a esta, inicia-se a diferenciação dos folhetos embrionários para a constituição dos tecidos (FERRO & BEVILACQUA, 1994).

1.5 - *Calomys callosus*

Calomys callosus pertence à superfamília Murídea. Nesta superfamília temos as famílias **Cricetidae** a qual pertencem os *hamsters*, *Voles* e *Calomys*, e **Muridae** que incluem os ratos e camundongos.

O gênero *Calomys* é comum na região sul-americana e tem porte semelhante ao camundongo. Ocorre na Argentina, na Bolívia, Paraguai e no Centro-Oeste, nordeste e sul do Brasil até o Estado do Paraná (MOOJEN, 1952; MASSOIA & FORNES, 1965; HERSHKOVITZ, 1962; MELLO, 1969; MELLO & MOOJEN, 1979). *Calomys callosus* tem atividade noturna (KARINI, ALMEIDA and PETTER, 1976; MELLO, 1977a; MARES, OJEDA and KOSCO, 1981) e os ninhos são construídos principalmente com folhas de gramíneas secas e estão escondidos entre os tufos de vegetação e folhagens.

Este cricetídeo tem se mostrado bastante adaptável quando em cativeiro, tornando-se um animal de utilização comum em laboratórios. Sob o aspecto reprodutivo, *Calomys callosus* é um roedor poliestro, tendo em média de 8-10 ninhadas por ano. JUSTINES & JOHNSON (1970) e MELLO (1978) verificaram a ocorrência de estro pós-parto.

O conhecimento da biologia deste animal é de fundamental importância, principalmente porque ele participa do ciclo de transmissão de microorganismos patogênico para o homem. Esses roedores são reservatórios naturais de *Trypanosoma cruzi* (RIBEIRO, 1973; MELLO & TEIXEIRA, 1977; MELLO, 1982), o agente etiológico da doença de Chagas, e transmissores da

febre hemorrágica Argentina (JUSTINES & JOHNSON, 1969). Esses animais também têm se mostrado altamente susceptíveis a doenças infecciosas como a esquistossomose e leishimaniose (MELLO, 1977b), o que tem proporcionado um excelente modelo biológico para o estudo destas doenças.

FAVORETO e colaboradores (1998) investigaram a susceptibilidade de *Calomys callosus* a infecções com *Toxoplasma gondii* e concluíram que este Cricetideo é um excelente modelo experimental para a fase aguda da doença. Por este e outros motivos é importante conhecer toda a biologia do animal, a fim de saber todas as suas peculiaridades.

SILVA & FERRO (2003) mostraram que a morfologia do processo de fertilização em *Calomys callosus* em muito se assemelha ao observado em outros roedores. FERRO & BEVILACQUA (1994) estabeleceram que o processo de implantação embrionária em *Calomys callosus* inicia-se na madrugada do 4º dia pós-fecundação. Entretanto, não há na literatura nenhum estudo que mostre a seqüência de eventos morfológicos que ocorrem anterior ao período de implantação. Assim, proceder-se-á a investigação morfológica do embrião em períodos que antecedem a implantação neste animal.

Neste trabalho estudaram-se as fases iniciais do desenvolvimento em *Calomys callosus* desde a fertilização até a fase de blastocisto. Para isto, analisou-se regiões da tuba uterina, a fim de flagrar os diversos estágios da gestação. O estudo levou em consideração os aspectos morfológicos, utilizando-se para isto microscopia de luz e análise morfométrica.

2 - OBJETIVOS

- Caracterizar cronologicamente as fases iniciais do desenvolvimento embrionário em *Calomys callosus* desde o estágio de óvulo até a fase de blastocisto utilizando-se microscopia de luz;
- Descrever os aspectos morfológicos das etapas do desenvolvimento no microambiente do organismo materno de *Calomys callosus*.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Espécimes

Calomys callosus, da linhagem Canabrava, foram gentilmente doados pelo laboratório de Histologia/Embriologia da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos no biotério deste laboratório com dieta *ad libitum* (FAVORETO-JUNIOR et al., 1998) de ração peletizada e água filtrada, complementada com semente de girassol, aveia e milho. Os animais foram mantidos em ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro em sala com temperatura média de 25°C.

3.2 - Acasalamento

O acasalamento dos espécimes se fez na proporção de duas fêmeas para cada macho. As fêmeas foram retiradas de suas gaiolas, colocadas nas gaiolas dos machos e lá permaneceram até a constatação da cópula. Para isto as fêmeas foram examinadas sempre pela manhã, e a presença de rolha vaginal confirmou a cópula do animal.

A rolha vaginal é uma espécie de tampão vaginal constituído pelo sêmem do macho que oblitera completamente o canal vaginal por um certo tempo. Este mecanismo impede o acasalamento da fêmea com outro macho logo após a cópula.

Na manhã em que a rolha foi identificada considerou-se que o animal estava no primeiro dia de gestação.

3.3 - Coleta do material

Fêmeas recém fertilizadas foram sacrificadas no 1º, 2º, 3º, e 4º dias de gestação. Com o intuito de se observar o maior número de etapas do processo de desenvolvimento, para cada dia de gestação, foram feitas coletas de material nos períodos da manhã, tarde, noite e madrugada nos seguintes horários, respectivamente: 9:00 , 15:00, 21:00 e 3:00 hs.

As fêmeas foram anestesiadas por inalação com éter etílico, realizando-se laparotomia logo em seguida. Os fragmentos contendo as tubas uterinas e ovários, direito e esquerdo, foram retirados e dissecados para a retirada do tecido adiposo. Em seguida os fragmentos foram fixados para microscopia de luz.

3.4 - Fixação e processamento do material para microscopia de luz

Após a coleta e dissecação do material os fragmentos contendo as tubas uterinas foram mantidos em solução fixadora de formol 10% em PBS 0,1M pH 7,2 por 24 horas. Após a fixação realizou-se a desidratação do material em uma série de etanóis em concentrações crescentes (50-100%). Feito isto, o material foi pré-infiltrado em uma mistura de resina pura¹ (1:1) e etanol absoluto por duas horas em temperatura ambiente. Os materiais foram imersos em resina pura (infiltração) por 24 horas para a impregnação da resina.

O material foi então incluído em formas de polietileno retangulares, previamente etiquetadas, utilizando-se 15 ml de resina pura e 1ml de endurecedor (derivado do ácido barbitúrico - dimetil sulfóxido) e deixados em temperatura ambiente para a

1- Resina Pura: 50 ml de resina básica + 5g de ativador

Kit Historesin (LEICA): Resina básica (Glicol Metacrilato)
Ativador (Peróxido de benzoila)
Endurecedor (Hardener)

polimerização da resina. Em seguida o material foi fixado em pequenos blocos de madeira e deixados na estufa a 60°C. Cortes seriados com 2µm de espessura foram feitos em um micrótomo (LEICA), aderidos em lâminas de vidro (26X7mm/1-1,2 mm) e corados com azul de toluidina 0,5%. As lâminas foram previamente analisadas para identificação dos embriões. A montagem das lâminas foi feita com resina Entellan® (MERCK) e lamínula de vidro (24x40 mm), sendo em seguida examinados ao microscópio de luz e posteriormente fotografados.

3.5 - Procedimentos para análise morfométrica do material

Depois de preparados, os cortes foram analisados por imagens digitalizadas em microscópio Olympus Triocular BX40, com uso de objetiva de 40X, acoplado a câmera OLYMPUS OLY 200, ligada a um computador através de placa digitalizadora Data Translation 3153. O programa HL Image 97++ foi utilizado para mensurar o diâmetro médio do embrião e a espessura da zona pelúcida. Foram escolhidas seis regiões aleatórias da zona pelúcida para se obter a média de sua espessura. Quanto ao diâmetro médio foram utilizadas as medidas totais (zona pelúcida + ovócito) do embrião. Foram medidos o diâmetro maior e o menor para o cálculo do diâmetro médio.

4 - RESULTADOS

Este trabalho buscou caracterizar as etapas do desenvolvimento que antecedem a implantação embrionária em *Calomys callosus* (Fig. 1a). Os resultados obtidos mostram a sequência de eventos que vão desde a fusão dos pronúcleos, no primeiro dia de gestação, até a fase de implantação, no quarto dia de gestação. No ovário observou-se ovócito com citoplasma pouco corado, núcleo de cromatina descondensada e nucléolo evidente. A zona pelúcida definia a interface ovócito-células foliculares (Fig. 1b).

4.1 - óvulo

Esta etapa foi observada no período da manhã do primeiro dia de gestação, logo após a constatação da rolha vaginal. Observaram-se diversos espermatozóides na luz da tuba uterina (Fig. 2a) o que ratificou a ocorrência da cópula entre os animais. Curiosamente, alguns espermatozóides foram observados no interior de algumas células na luz da tuba uterina (Fig. 2a). O ovócito foi flagrado no período em que antecedeu a fusão dos pronúcleos, estando os mesmos dispostos lateralmente no ooplasma (Fig. 2b).

A região medular do óvulo caracterizou-se por apresentar menor intensidade cromática que a cortical (Fig. 2b). Eventualmente observaram-se projeções na estrutura da zona pelúcida (Figs. 2b e 3a). O corpúsculo polar situava-se entre a zona pelúcida e membrana do ovócito no espaço perivitelínico (Fig. 3b).

A zona pelúcida circundava todo o óvulo e com relativa intensidade cromática. Algumas células da *corona radiata* se faziam presentes ao redor da zona pelúcida (Fig. 3b).

No epitélio da tuba uterina foi possível notar células ciliadas (Fig. 3b) bem como células secretoras.

4.2 - Estágio de zigoto

Esta etapa foi melhor evidenciada no período da tarde do primeiro dia de gestação, com fusão dos pronúcleos, caracterizando a fase de zigoto. Numerosos pontos heterocromáticos de diferentes tamanhos foram observados tanto no núcleo do óvulo (**Fig. 3b**) quanto no núcleo do zigoto (**Fig. 4a**).

O ooplasma apresentou diferentes intensidades cromáticas e com relativa homogenia nos padrões de distribuição. Entretanto na região central foi possível verificar inúmeras regiões com pouca intensidade cromática. Pode-se observar dois corpúsculos polares em posições opostas (**Fig. 3b**). A zona pelúcida mostrou-se totalmente íntegra estando em contato com algumas células do epitélio tubário. Discretas projeções da zona pelúcida puderam ser observadas fazendo saliência na luz estreita da tuba uterina (**Fig.4b**).

4.3 - Estágio de dois Blastômeros

Esta etapa foi observada no início da noite do primeiro dia de gestação. O zigoto iniciou o processo de divisão celular (clivagens) podendo ser flagrado no estágio de dois blastômeros (**Fig. 5a**).

Os núcleos dos dois blastômeros apresentaram numerosos pontos heterocromáticos, arredondados e de tamanhos variados. O citoplasma apresentou áreas citoplasmáticas com diferentes intensidades cromáticas. Foi possível notar a estreita proximidade entre os dois blastômeros, mas com espaço evidente entre a zona pelúcida e os blastômeros (**Fig. 5a**).

4.4 - Estágio de mórula

Esta etapa do desenvolvimento foi observada na tarde do terceiro dia de gestação. Neste estágio o número de blastômeros aumentou. Também foi possível observar algumas células da *corona radiata* acopladas à zona pelúcida (Fig. 5b).

Os blastômeros apresentaram tamanhos diferentes e, além disso, foi possível notar alguns espaços entre eles e a zona pelúcida, indicando uma maior distância entre blastômeros. O embrião ainda estava na luz da tuba. Nesta fase a zona pelúcida demonstrou estar relativamente mais delgada em relação às etapas anteriores (Fig. 5b).

4.5 - Estágio de blastocisto

Esta etapa pôde ser observada na manhã do quarto dia de gestação. O embrião encontrou-se em processo de implantação (nidação) sendo flagrado na mucosa uterina em estreita proximidade ao epitélio uterino (Fig. 6).

A zona pelúcida não foi observada. O embrião mostrou-se cercado por uma camada de células trofoblásticas. Internamente ao embrião observou-se a blastocèle e a massa celular interna. Todas as células do embrião apresentaram núcleos com cromatina frouxa. A mucosa uterina ao redor do embrião mostrou uma intensa proliferação celular e numerosos vasos sanguíneos (Fig. 6).

4.6 – Espessura da zona pelúcida e diâmetro embrionário

A análise morfométrica para mensurar a espessura da zona pelúcida foi realizada medindo-se pontos aleatórios ao longo de toda a sua espessura. Para obter o diâmetro médio do embrião, mediu-se o diâmetro maior e o menor. A espessura média da zona pelúcida na fase

de ovócito foi de $5,8\mu\text{m}$ e, gradualmente, observou-se um processo de adelgaçamento até aproximadamente $3,4\mu\text{m}$ no estágio de mórula (**Tabela 1**). O diâmetro médio do embrião apresentou poucas variações, exceto no estágio de blastocisto onde observou-se um aumento no diâmetro do embrião, passando de cerca de $60\mu\text{m}$ no estágio de zigoto para $103\mu\text{m}$ no estágio de blastocisto.

5 - DISCUSSÃO

Diferentes espécies já tiveram seu desenvolvimento embrionário caracterizado morfológicamente em períodos que antecedem a implantação: camundongo (SNELL, 1969), homem (AHUJA et al., 1985), coelho, porco e gado (HEYMAN, 1988; PLACHOT et al., 1988), gato (SWANSON et al., 1994) e ovelhas (FERRER et al., 1995).

Neste trabalho procurou-se caracterizar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário em *C. callosus* "in-vivo", onde os diferentes estágios foram observados. Nos estágios de pré-implantação, observou-se óvulo, zigoto, estágio de dois blastômeros, mórula e blastocisto.

O citoplasma do óvulo apresentou áreas de menor intensidade cromática até a fase de dois blastômeros. Esta diferença na pigmentação do citoplasma foi observada também por NILI e colaboradores (2004) no ovócito de *Camelus dromedarius*, onde caracterizou-se uma área central com um grande número de gotas e vesículas de lipídios. Assim as regiões com menor intensidade cromática provavelmente sejam áreas de acúmulos de lipídios.

As células ciladas observadas na luz da tuba uterina relacionam-se, através de seus batimentos ciliares, com a condução do embrião em direção ao útero. Da mesma forma, as células secretoras atuam na produção de substâncias necessárias para a manutenção do embrião (GILBERT, 2002).

O estágio de zigoto foi observado ainda no primeiro dia de gestação, apresentando morfologia comum a outros mamíferos. Na zona pelúcida do zigoto observou-se projeções. Provavelmente isto deve-se à pressão causada pela mucosa da tuba uterina sobre a superfície do embrião.

Logo em seguida iniciou-se o processo de clivagem. A clivagem é uma série de rápidas mitoses onde o volume do zigoto é dividido em várias células menores (FELIPE et al., 2004). O padrão de clivagem embrionária é particular para cada espécie, sendo determinada por dois

parâmetros principais: a quantidade e distribuição do vitelo dentro do citoplasma e fatores no citoplasma do óvulo que influenciam no ângulo e no tempo de formação do fuso mitótico (EYAL-GILADI, 1997).

A primeira clivagem é uma divisão meridiana normal; contudo na segunda divisão, um dos blastômeros divide meridionalmente e o outro divide equatorialmente (FELIPE et al., 2004). Morfologicamente o aspecto do zigoto se assemelha a outros roedores.

O estágio de dois blastômeros foi observado na noite do primeiro dia de gestação. O embrião foi flagrado na fase de duas células. Os dois blastômeros encontravam-se totalmente individualizados, sugerindo um padrão de clivagem holoblástica ou total. Esta classificação é sugerida aqui por causa da baixa quantidade de vitelo presente no citoplasma do ovócito (EYAL-GILADI, 1997).

O embrião de *C. callosus* nesta etapa do desenvolvimento apresentou uma forma cilíndrica que foi definida pela forma dos blastômeros, acompanhados pela zona pelúcida. Esta forma não é muito comum nos trabalhos desenvolvidos "in-vitro". Esta disposição cilíndrica possivelmente é uma consequência da pressão exercida pelas paredes da tuba uterina sobre o embrião.

Em *C. callosus* a primeira clivagem é simétrica originando dois blastômeros ampliados com morfologia e tamanhos similares. Estas mesmas características também foram observadas nos embriões de cobaia e ratos (HUNTER et al., 1969).

No trabalho desenvolvido por FELIPE e colaboradores (2004) observaram a presença de corpúsculo polar no espaço entre os blastômeros em todos os embriões nos estágios de 2 - 8 células. No embrião de *C. callosus* no estágio de duas células não foi possível observar corpúsculos polares sendo possível a sua observação apenas nos estágios de pré-fusão dos pronúcleos e de zigoto. Provavelmente tais estruturas foram acidentalmente desprezadas durante os procedimentos de microtomia ou o corte não passou por eles.

Uma diferença crucial entre a clivagem de mamíferos e todos os outros tipos de clivagem é o fenômeno da compactação. Os blastômeros de mamíferos até o estágio de oito células formam um arranjo frouxo com espaço abundante entre eles. Após a terceira clivagem os blastômeros se amontoam aumentando o contato entre si (GILBERT, 2002) constituindo a mórula.

A compactação é o primeiro evento morfológico do desenvolvimento da pré-implantação. Ele é caracterizado por um aumento do contato celular entre os blastômeros (WATSON et al., 2004).

Esta fase do desenvolvimento em *C. callosus* foi observada na tarde do terceiro dia de gestação e, quanto à disposição celular, a mórula de *C. callosus* apresentou blastômeros com um alto grau de independência, tendo poucas superfícies de contato.

Este mesmo aspecto foi observado nos embriões de cobaia em estágio de quatro células (HUNTER et al., 1969), porém, estas características não foram vistas nos embriões de rato do mesmo estágio, onde a distancia entre os blastômeros foi mínima (SCHLDAFKE & ENDERS, 1967). O embrião de coypu (ratão-do-mato) no estágio de oito células também apresentou uma maior proximidade entre os blastômeros segundo o trabalho de FELIPE e colaboradores (2004).

A zona pelúcida estava, no estágio de mórula, relativamente mais delgada em relação aos demais estágios. Isto pode sugerir um desgaste das proteínas da zona pelúcida já que a espessura da zona pelúcida (3,4 μ m) foi menor em comparação com os estágios precedentes.

Assim que a compactação ocorre, as células externas do embrião começam elaborar seus complexos juncionais principalmente seus sistemas de transporte de íons em preparação para a formação do blastocisto (FLEMING et al., 2000).

A presença de um sistema NA/K-ATPase na parede do trofoblasto (WATSON & KIDDER, 1988) mantém um gradiente iônico e promove o acúmulo de água no interior do embrião (WATSON & BARCROFT, 2001). O sistema NA/K-ATPase transporta Na^+ para fora e

K⁺ para dentro da célula contra o gradiente de concentração (KAPLAN, 2002). Com isso ocorre a entrada de líquido para o interior do embrião, formando assim uma estrutura cavitária: o blastocisto.

O blastocisto foi observado na manhã do quarto dia de gestação em processo de implantação. Neste estágio a zona pelúcida não estava mais presente.

Para conseguir implantar-se na mucosa uterina o embrião adquiriu um epitélio especializado chamado de trofoblasto. O trofoblasto é o primeiro tipo de célula diferenciada no embrião, formando uma camada de células externas do blastocisto que envolve a massa celular interna (WILEY, 1987; BIGGERS et al., 1988). Tanto a massa celular interna quanto o trofoblasto foram bem visualizadas no embrião de *Calomys callosus*.

O trofoblasto inicia um contato com o endométrio e promove a invasão do embrião no endométrio durante a implantação (WATSON et al., 2004). Esta invasão é permitida porque o trofoblasto secreta algumas proteases, tais como collagenase, estromalisina e ativador de plasminogênio que digere a matriz extracelular do tecido uterino. Os vasos sanguíneos que apareceram próximo ao blastocisto indicam um suprimento vascular materno no início da gestação até que a placenta se estabeleça (GILBERT, 2002). Sendo assim, morfologicamente o blastocisto de *Calomys callosus* possui as mesmas características observadas nos demais mamíferos.

Através das análises morfométricas pode-se notar que comparativamente o embrião quase duplicou o seu tamanho quando comparado o blastocisto com o óvulo.

O crescimento do embrião se deve inteiramente as crescentes divisões mitóticas sofridas pelo embrião, bem como a entrada de líquido para a formação da blastocèle (GILBERT, 2002). Entretanto do estágio de óvulo até o estágio de mórula o embrião não apresentou um crescimento significativo, ficando em torno de 60-68µm.

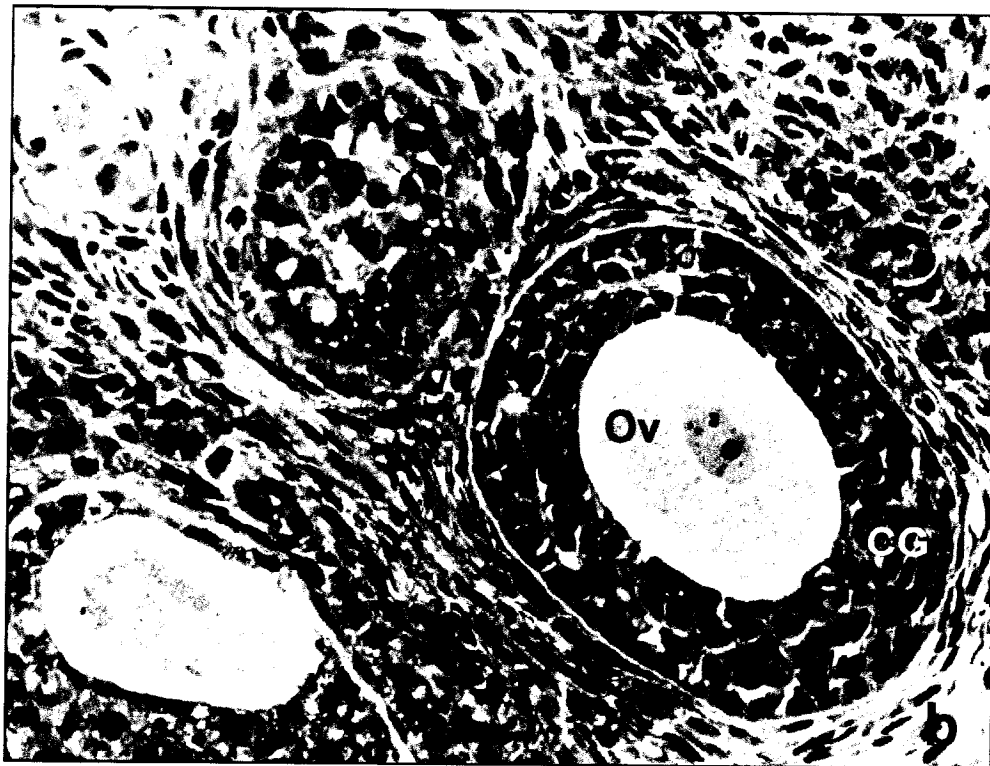
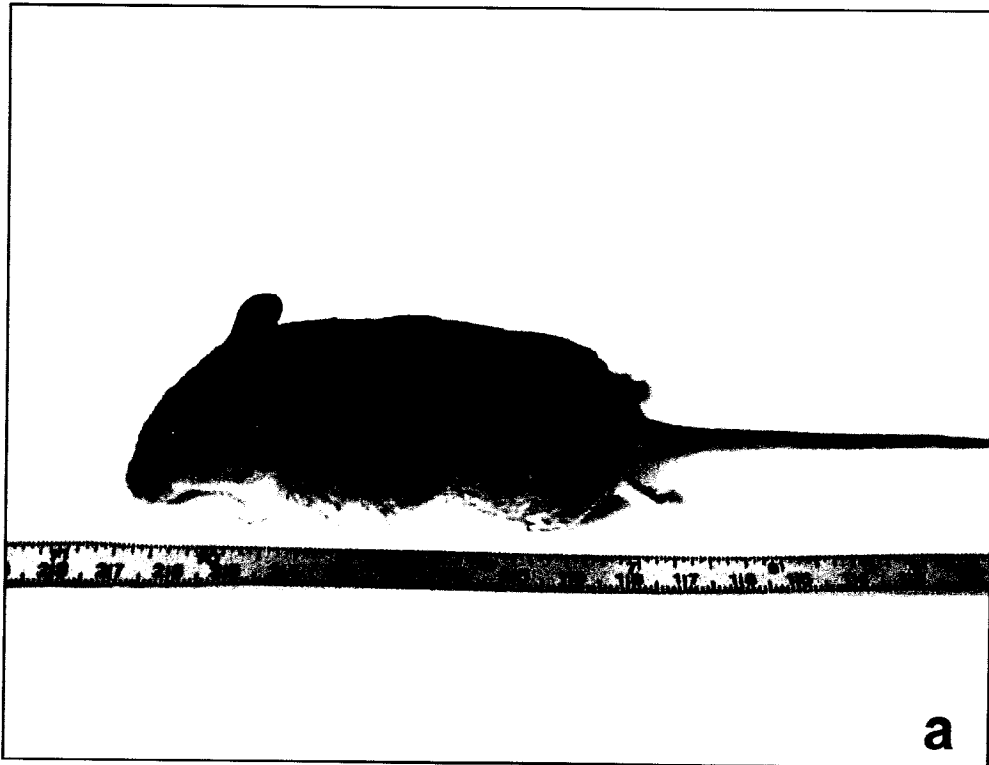
FELIPE e colaboradores (2004) descreveram uma espessura 15.7µm para a zona pelúcida do embrião de *Myocastor coypus* (rato-do-mato) no estágio de duas células. Neste

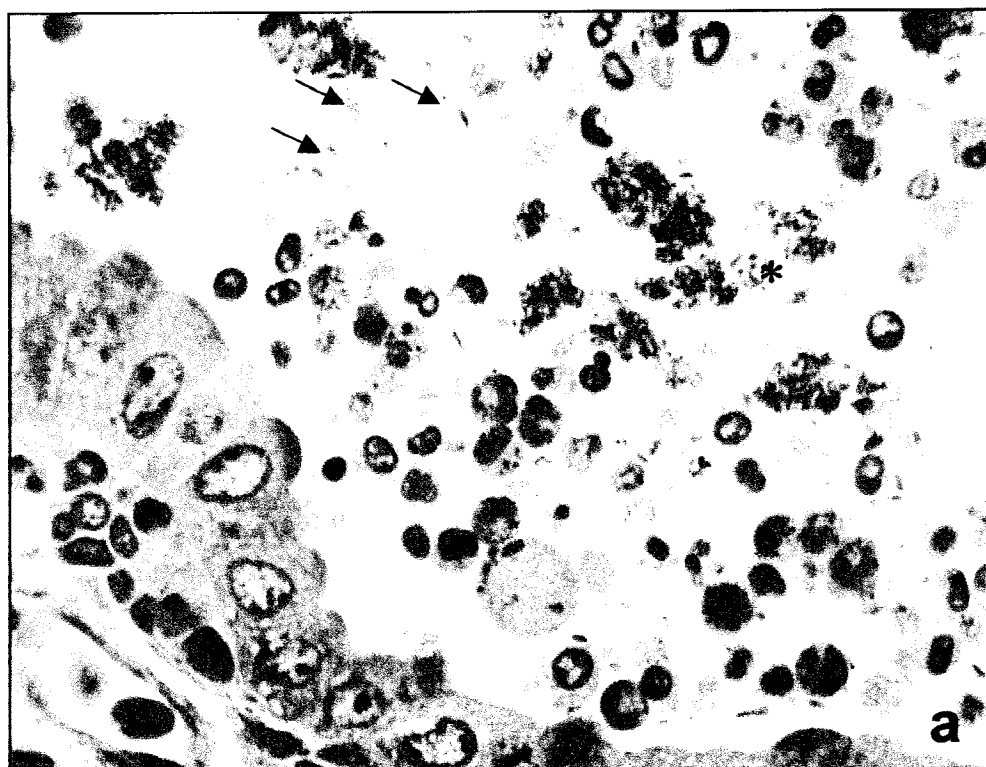
trabalho foi observada uma espessura média de 4,5µm para o estágio de duas células. Provavelmente a espessura da zona pelúcida seja característica de grupos ou espécies animais e, à semelhança com demais roedores, a perda da zona pelúcida esteja relacionada à atividade enzimática de células trofoblásticas (FERRO & BEVILACQUA, 1994).

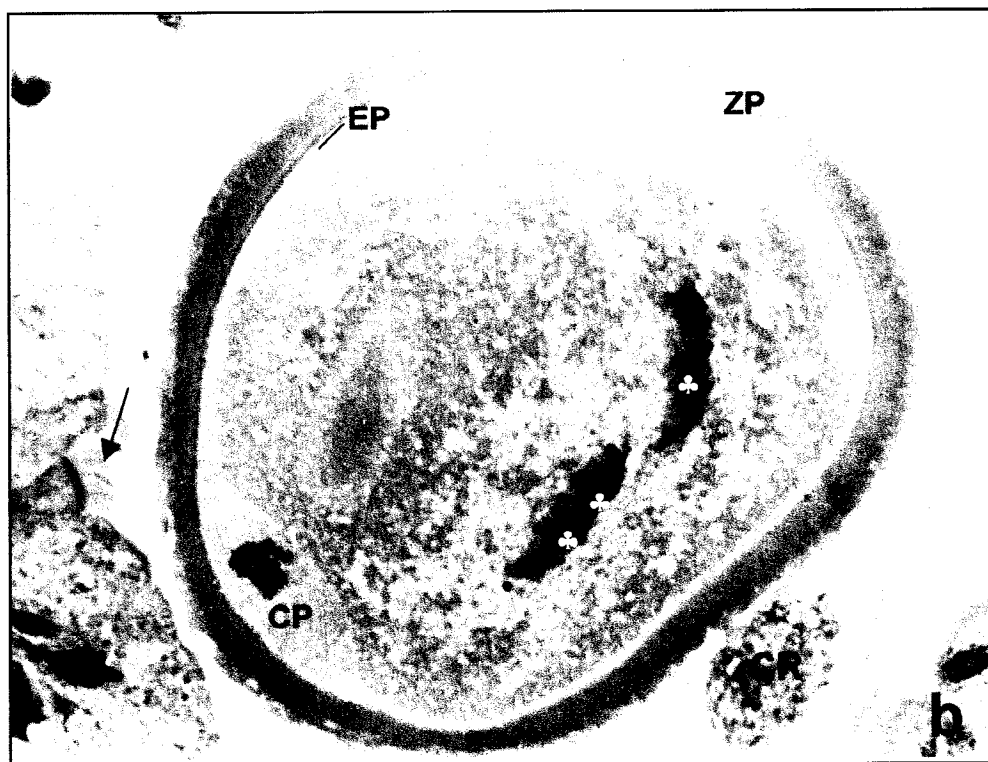
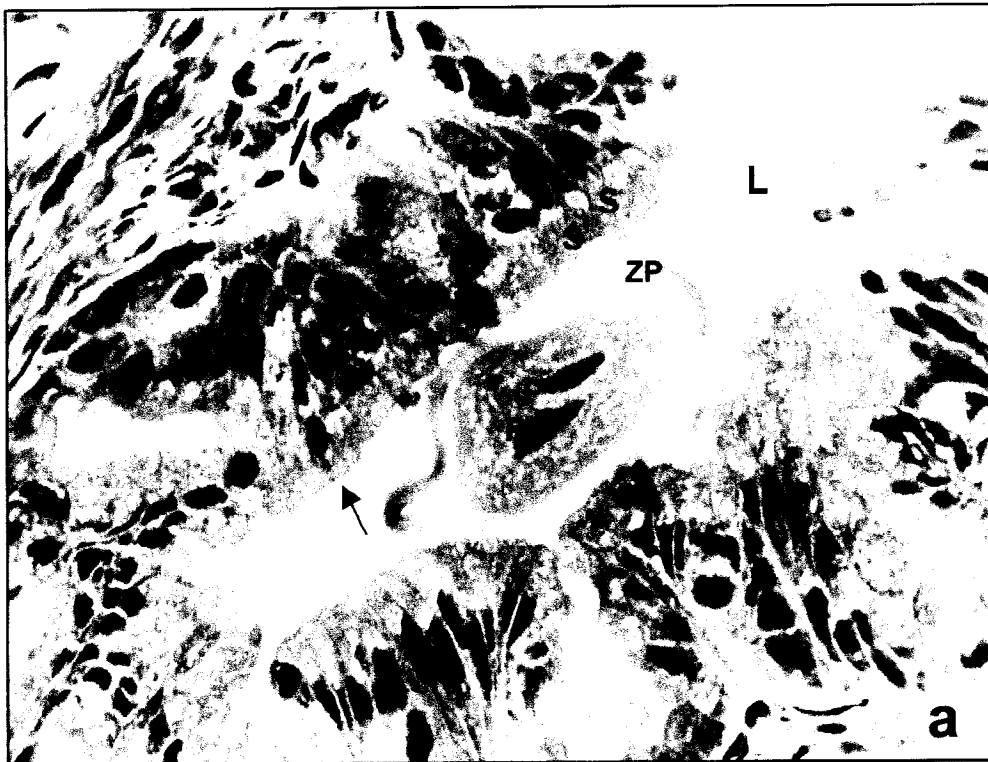
6 - CONCLUSÕES

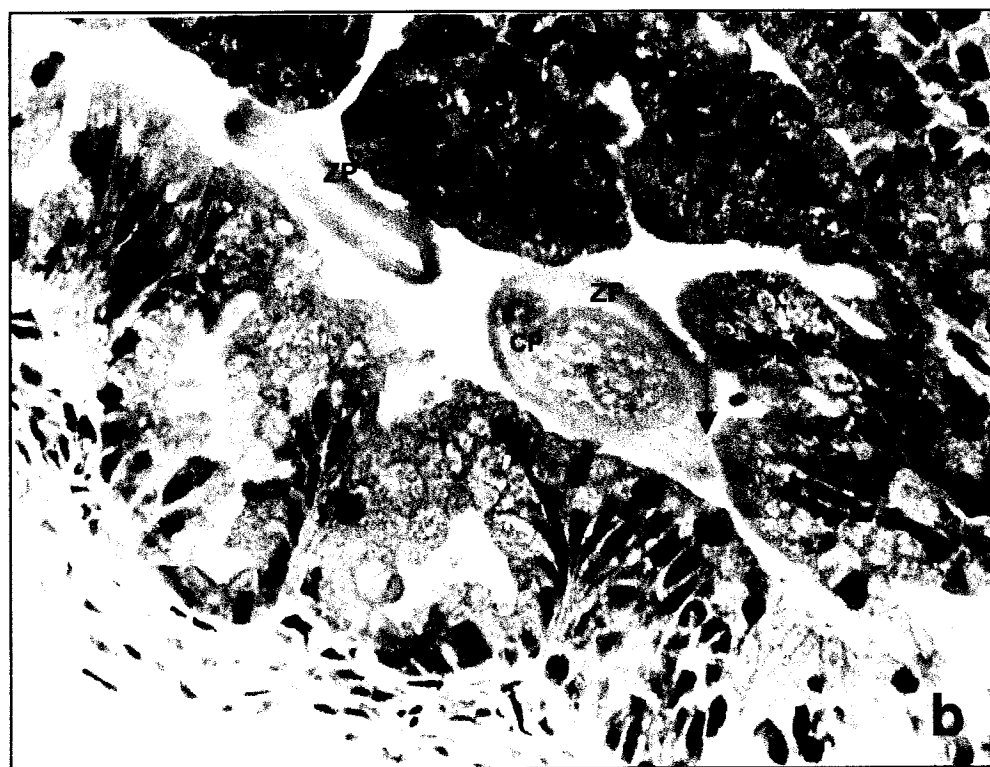
- O embrião de *C. callosus*, em todas as fases, apresentou morfologia semelhante a dos demais mamíferos;
- A fase de ovócito foi observada na manhã do primeiro dia de gestação, a fase de zigoto foi observada na tarde do primeiro dia de gestação; a fase de dois blastômeros foi observada na noite do primeiro dia, a fase de mórula foi observada na tarde do terceiro dia de gestação e a fase de blastocisto na manhã do quarto dia de gestação.
- O embrião apresentou padrão de clivagem holoblástica com primeira clivagem simétrica;
- A mórula apresentou blastômeros com alto grau de independência entre eles;
- O embrião cresce acentuadamente na fase de blastocisto;
- A zona pelúcida tornou-se acentuadamente mais delgada no estágio de mórula.

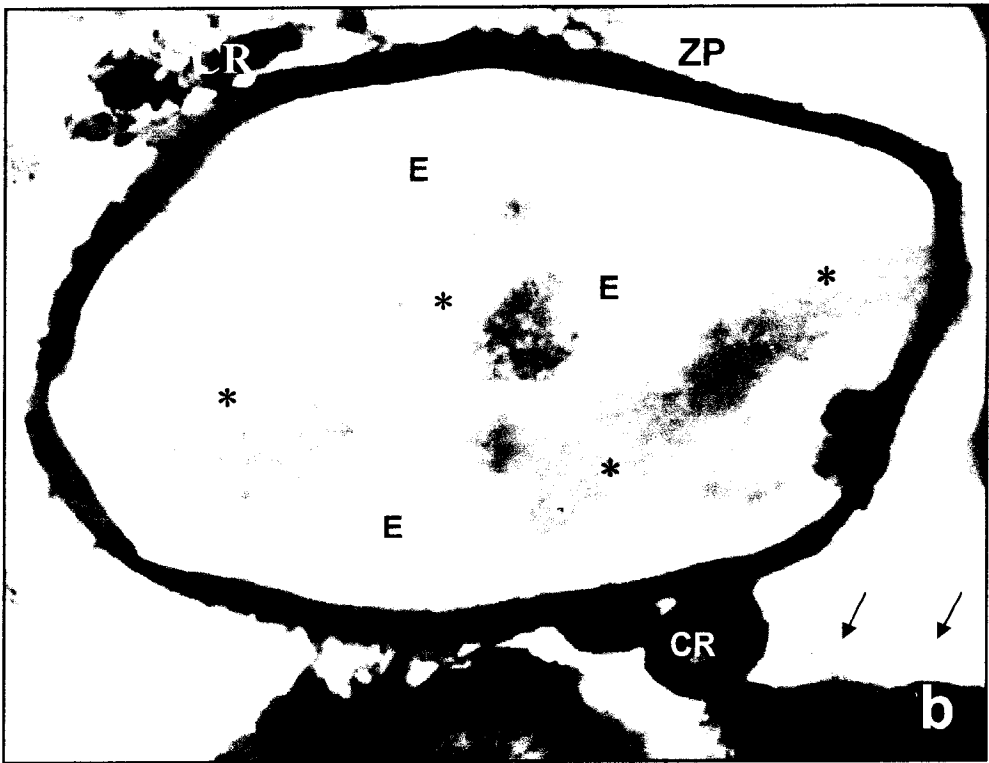
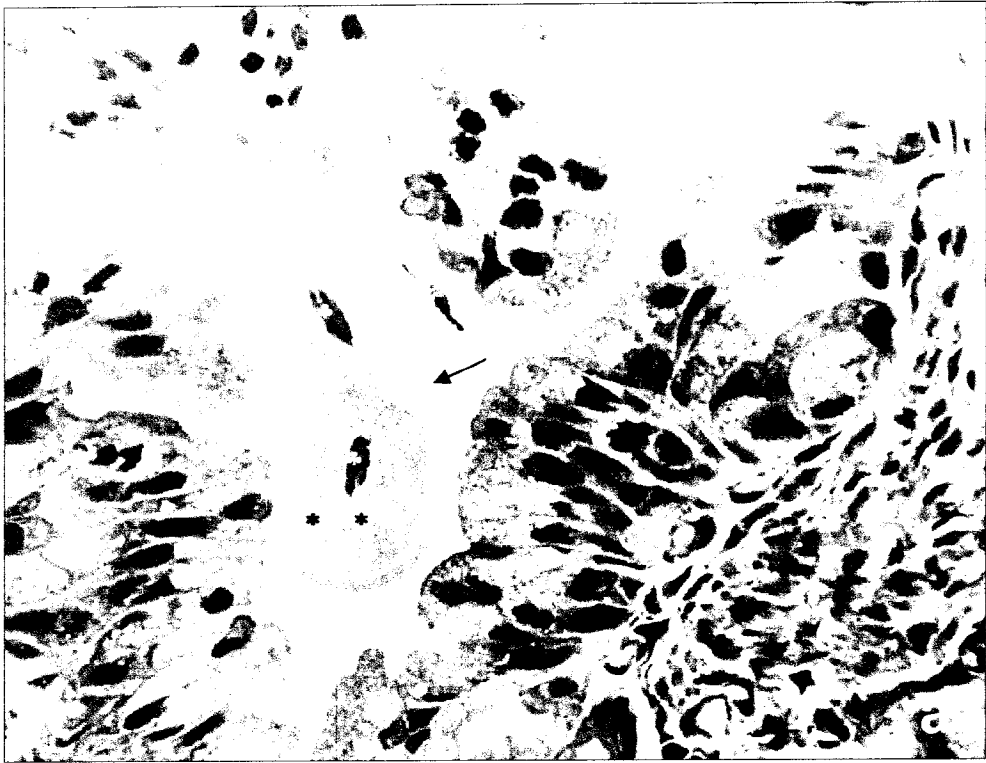
Documentação Fotográfica











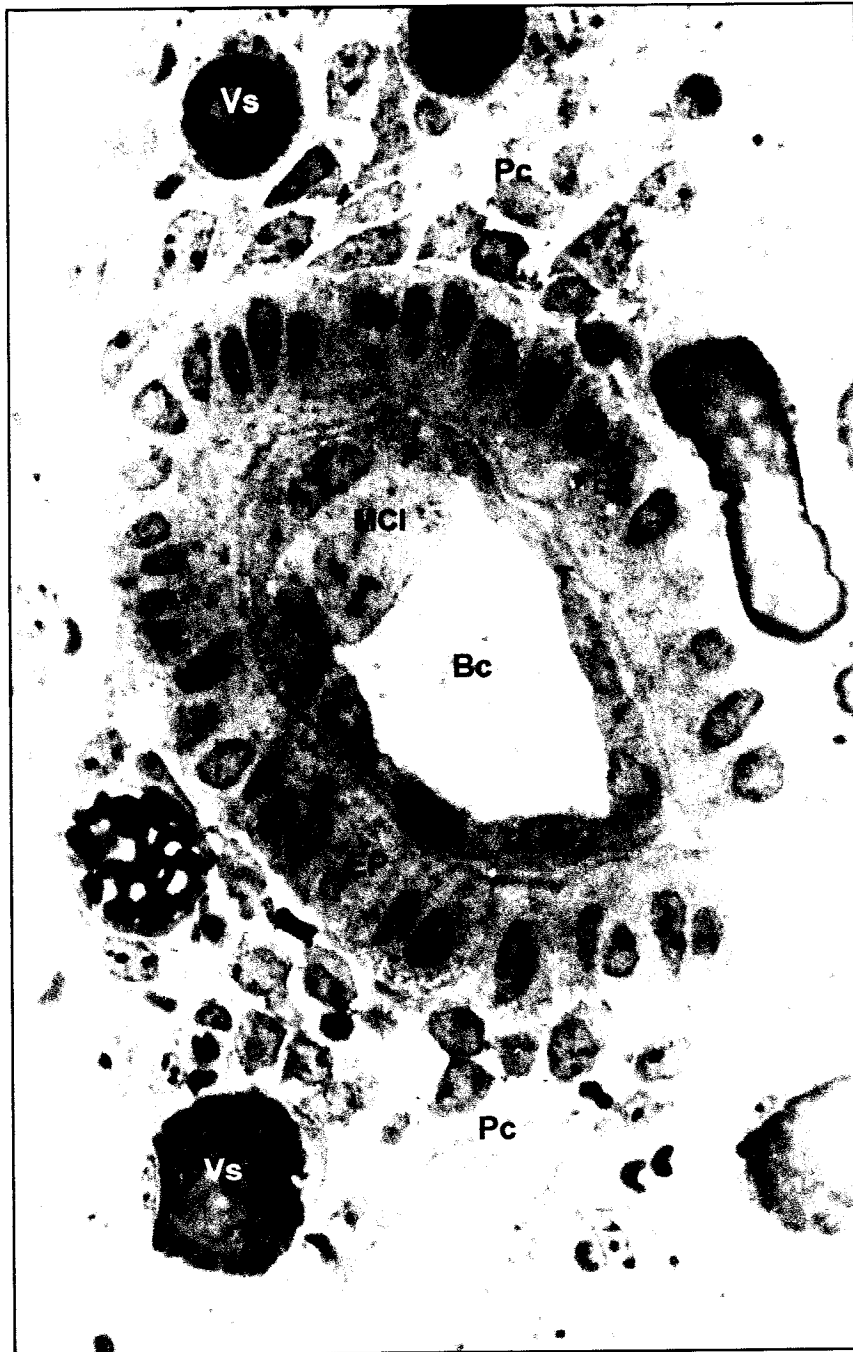


Tabela 1- análise morfométrica dos estágios embrionários

Estágio	Espessura da Zona Pelúcida (μm)	Diâmetro médio* (μm)	
Óvulo	5,8	60	
Fusão dos Pronúcleos	4,0	64	
Zigoto	4,6	56	Com zona pelúcida
Dois blastômeros	4,5	60	
Mórula	3,4	68	
Blástula	-	103	Sem zona pelúcida

* Média do diâmetro total do embrião (Zona pelúcida + ovócito).

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, K.K.; SMITH, N.; TUCKER, M. and CRAFT, I. 1985. Successful pregnancies from the transfer of pronucleate embryos in an outpatient in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 44:181-184.
- ALMEIDA, E.A.C.; HUOVILA, J.; SUTHERLAND, A.E. et al. 1995. Mouse egg integrin $\alpha 6, \beta 1$ function as a sperm receptor. *Cell* 81:1095-1104.
- AMANN, R.P. et al. 1995. What is semen: how does semen analysis assist in understanding the reproductive status of the male? In: Robaire, B.; Pryor, J.L. and Traster, J.M (eds) *Handbook of Andrology*. São Francisco: American Society of Andrology.
- ANDERSON, E. & BEAMS, H.W. 1960. Cytologic observations on the fine structure of the guinea pig ovary with special reference to the oogonium, primary oocyte and associated follicle cell. *J Ultrastruct Res* 3:432-446.
- ASCH, R.; SIMERLY C.; ORD T.; ORD V.A.; SCHATTEN G. 1995. The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Hum Reprod* 10:1897-1906.
- AUSTIN, C.R. 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170:326.
- BANKS, W.J. 1992. *Histologia veterinária aplicada*. 2ª ed. São Paulo: Manole
- BARROS, C. 1968. In vitro capacitation of golden hamster spermatozoa with fallopian tube fluid of the mouse and rat. *J Reprod Fert* 17:203-206.
- BEIL, J. D. & WASSARMAN, P. M. 1990. Identification of a Zp3-binding protein on acrossome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5563-5567.
- BIGGERS, J.D.; BELL, J.E. AND BENOS, D.J. 1988. Mammalian blastocyst: transport functions in a developing epithelium. *Am J Physiol* 255:419-432.

BLOCK, E. 1952. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women. variations at different ages. *Acta Anat* 14(Suppl 16):108-123.

CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A.; FRENEAU, G.E. 2002. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. *J Bras patol Med Lab* 38(1):33-38.

CHIAN, R.C.; NAKAHARA, H.; KIWA, K. et al. 1992. Fertilization and early cleavage in vitro of ageing bovine oocytes after maturation in culture. *Theriogenology* 37:665-672.

CLOSE, C.E.; ROBERTS, P.L.; BERGER, R.E. 1990. Cigarettes, alcohol and marijuana are related to pyospermia in infertile men. *J Urol* 144:900-903.

CORNETT, L.E. & S. MEIZEL. 1978. Stimulation of in vitro activation and the acrosome reaction of hamster spermatozoa by catecholamines. *Proc Nat Acad Sci (U.S.A)* 75:4954-4958.

DAVIS, B.K. 1981. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipids ratio as determinant of capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7560-7564.

ELINSON, R.P. 1985. Changes in levels of polymeric tubulin associated with activation and dorsoventral polarization of the frog egg. *Dev Biol* 109:224-233.

EYAL-GILADI, H. 1997. Establishment of the axis in chordates: facts and speculations. *Devel.* 124:2285-2296.

FAVORETO-JUNIOR, S.; FERRO, E.A.V.; CLEMENTE, D.; SILVA, D.A.O.; MINEO, J.R. 1998. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93(1):103-107.

FELIPE, A.E.; TERUEL, M.T.; CABODEVILA, J.A and CALLEJAS, S.S. 2004. Morphological aspects of in vivo cleavage in *Myocastor coypus* (coypu). *Anat Histol Embriol* 33:75-80.

FERRER, F.; GARCÍA, C.; VILLAR, J. and ARIAS, M. 1995. Ultrastructural study of the early development of the sheep embryo. *Anat Histol Embryol* 24:191-196.

- FERRIS, C.D.; HUGANIR, R.L.; SUPATTAPONE, S. and SNYDER, S.H. 1989. Purified inositol1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature* 342:87-89.
- FERRO, E.A.V & BEVILACQUA, E. 1994. Trophoblastic invasion of the uterine epithelium in *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae). *J Morph* 221:139-152.
- FLEMING, T.P.; GHASSEMIFAR, M.R. and SHETH, B. 2000. Junctional complexes in the early mammalian embryo. *Semin Reprod Med* 18:185-193.
- FLORMAN, H.M. & WASSARMAN, P.M. 1985. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 41:313-324.
- FURUICHI, T.; YOSHIKAWA, S.; MIYAWAKI, A.; WADA, K.; MAEDA, N. and MIKOSHIBA, K. 1989. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* 342:32-38.
- FUSI, F.M; VIGNALI, M.; GAILIT, J. et al. 1993. Mammalian oocytes exhibit specific recognition of the RGD (Arg- Gly- Asp) tripeptide and express oolemmal integrins. *Mol Reprod Dev* 36:212-219.
- GEHART, J.; UBBELS, G.; BLACK, S.; HARA, K. and KIRSCHNER, M. 1981. A Reinvestigation of the role of the grey crescent in axis formation in *Xenopus laevis*. *Nature* 292:511-516.
- GILBERT, S.F. 2002. Fecundação: Iniciando um novo organismo. In: *Biologia do Desenvolvimento* (1949). Ribeirão Preto: FUMPEC, 564p.
- GONDOS, B. & ZAMBONI, L. 1967. Electron microscopic studies of the embryogenesis and postnatal development of the rabbit ovary. *J Ultrastruct Res* 21:162.
- GWATKIN, R.B.L.; ANDERSEN, O.F. and HUTCHINSON, C.F. 1972. Capacitation of hamster sperm in vitro: the role of cumulus components. *J Reprod Fert* 30:389-394.

- KARINI, Y.; ALMEIDA, C.R. and PETTER, F. 1976. Note sur les Rogeurs du nord-est du Brèsil. *Mammalia* 40:258-266.
- KOLLIKER, 1840. In: GILBERT, S.F. 2002. *Biologia do desenvolvimento*. Ribeirão Preto: FUMPEC. 564p.
- LEEUWENHOEK, A.V. 1685. Leter to the Royal Society of London. Quoted in E.G. Ruestow, 1983, Images and ideas: Leeuwenhoek's perception of the spermatozoa. *J Hist Biol* 16:185-224.
- LIN, P.C.; BHATNAGAR, K.P.; NETTLETON, G.S.; NAKAJIMA, S.T. 2002. Female genital anomalies affecting reproction. *Fertil Steril* 78:899-915.
- LOPEZ, L.C.; BAYNA, E.M.; LITOFF, D.; SHAPER, N.L; SHAPER, J.H. and SHUR, B.D. 1985. Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J Cell Biol* 101:1501-1510.
- MAK, V.; JARVI, K.; BUCKSPAN, M.; FREEMAN, M.; HECHTER, S.; ZINI, A. 2000. Smoking is associated with the retention of cytoplasm by human spermatozoa. *Urol* 56:463-566.
- MANES, M.E.; ELINSON, R.P. and BARBIERI, F.D. 1978. Formation of the amphibiam gray crescent: effects of colchicines and cytochalasin-B. *Wilhelm Roux Arch Dev Biol* 185:99-104.
- MARES, M.A.; OJEDA, R.A. and KOSCO, M.P. 1981. Observations on the distribution and ecology of the mammals of Salta Province, Argentina. *Ann Carneg Mus* 50:151-206.
- MASSOIA, E. & FORNES, A. 1965. Nuevos datos sobe la morfologia, distribuicion geografica y etoecologia de *Calomys callosus callosus* (Rengger)(Rodentia-Cricetidae). *Physis* 25:325.
- MELLO, D.A. & MOOJEN, L. 1979. Notas sobre uma coleção de roedores e marsupiais de algumas regiões do cerrado do Brasil Central. *Rev Bras Pes Med Biol* 12:287-291.
- MELLO, D.A. & TEIXEIRA, M.L. 1977. Nota sobre a infecção natural de *Calomys expulsus* Lund, 1841 (Cricetidae-Rodentia) pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Saúde Publ São Paulo* 11:561-564.

- MELLO, D.A. 1969. Roedores silvestres de alguns municípios do Estado de Pernambuco e suas regiões naturais. *Rev Bras Pesq Med Biol* 2:360-362.
- MELLO, D.A. 1977a. Note on breeding of *Calomys callosus* Lund, 1841 (rodentia-Cricetidae) under laboratory conditions. *Rev Bras Pesq Med Biol* 10:107.
- MELLO, D.A. 1978. Biology of *Calomys callosus* (Renger, 1830) under laboratory conditions (Rodentia-Cricetidae). *Rev Bras Biol* 38:807-811.
- MELLO, D.A. 1982. Roedores, marsupiais e triatomíneos silvestres capturados no município de Mambai - Goiás. Infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Saúde Publ. S. Paulo* 16:282-291.
- MELLO, D.A. 1984. *Calomys callosus* Rengger, 1830 (Rodentia Cricetidae): sua caracterização, distribuição e manejo de uma cepa em laboratório. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 79(1):37-44.
- MERINO, G.; LIRA, S.C.; MARTINEZ-CHEQUER, J.C. 1998. Effects of cigarette smoking on semen characteristics of a population in Mexico. *Arch Androl* 41:11-15.
- MOOJEN J. 1952. Os roedores do Brasil, Instituto Nacional do Livro, Biblioteca científica Brasileira, série A - II.
- MOORE, K.L. & PERSAUD, T.V.N. 2000. In: *Embriologia básica*, 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 356p.
- MUNNE, S.; ALIKANI, M.; TOMKIN, G.; GRIFO, J.; COHEN, J. 1995. Embryo Morphology, developmental rats, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 64:382-391.
- MYLES, D.G. 1995. How does spermatozoon make its way to the egg and how does fertilization take place? In: Robaire, B.; Pryor, J.L. & Trasler, J.M. (eds) *Handbook of Andrology*. São Francisco: American Society of Andrology.

- MYLES, G. D. 1993. Molecular mechanism of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. *Dev Biol* 158:35-45.
- NILI, H.; MESBAH, F.; KAFI, M. and HASR ESFAHANI, M.H. 2004. Light and transmission electron microscopy of immature *Camelus dromedaries* oocyte. *Anat Histl Embryol* 33:196-199.
- PARINAUD, J.; MIEUSSET, R.; VIEITEZ, G.; LABAL, B.; RICHAILLEY, G. 1993. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril* 60:888-892.
- PLACHOT, M.; JUNCA, A.M.; MANDELBAUM, J.; COHEN, J. and SALAT BAROUX, J. 1988. Les échecs du développement embryonnaire. *Reprod Nutr Dév* 28:1781-1790.
- POIRIER, G.R. & JACKSON, J. 1981. Isolation and characterization of two proteinase inhibitors from the male reproductive tract of mice. *Gamete Res* 4:555-569.
- PRIMAKOFF, P.; HYATT, H.; TREDIC-KLINE, J. 1987. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol* 104:141-149.
- RAVEN, CHR. P. 1961. Oogenesis. The storage of developmental information. Oxford, London, New York, Paris: Pergamon press.
- REHMAN, N.; COLLINS, A.R.; SUH, T.K. et al. 1994. Effect of exposure time on in vitro fertilization and embryo development of oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 41:1447-1452.
- RIBEIRO, R.D. 1973. Novos reservatórios do *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Biol* 33:429-537.
- RON-EL, R.; NACHUM, H.; HERMAN, A.; GOLAN, A.; CASPI, E.; SOFFER, Y. 1991. Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. *Fertil Steril* 55:338-344.
- SAEKI, K.; KATO, H.; HOSOI, Y. et al. 1991. Early morphological events of in vitro fertilized bovine oocytes with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 35:1051-1058.

- SALING, P. M. 1989. Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 11:339-388.
- SALUMENTS, A.; SUIKKARI, A.M.; MOLS, T.; ANTTILA, V.S.; TUURI, T. 2002. Influence of oocytes and spermatozoa on early embryonic development. *Fertil Steril* 78(5):1082-1087.
- SCHLAFKE, S. & ENDERS, A.C. 1967. Cytological changes during cleavage and blastocyst formation in the rat. *J Anat* 102:13-32.
- SHEN, S.S. & BURGART, L.J. 1986. 1,2-Diacylglycerols mimic phorbol 12-myristate 13-acetate activation of the sea urchin egg. *J Cell Physiol* 127:330-340.
- SILVA, M and FERRO, E.A.V. 2003. Interação espermatozóide-oócito no Cricetídeo *Calomys callosus*: Uma abordagem ultraestrutural da fertilização. *Rev Bras Reprod Anim* 27(4):689-694.
- SNELL, G.D. 1969. The early embryology of the laboratory mouse. In: *Biology of the laboratory Mouse* (G.D. Snell, ed.). Philadelphia: Blakiston, pp. 1-54.
- SOFIKITIS, N.; MIYAGAWA, I.; DIMITRIADIS, D.; ZAVOS, P.; SIKKA, S.; HELLSTROM, W. 1995. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol* 154:1030-1034.
- STILLMAN, R.J.; ROSENBREG, M.J.; SACHS, B.P. 1986. Smoking and reproduction. *Fertil Steril* 46:545-566.
- SWANN, K. and WHITAKER, M. 1985. Stimulation of the NA/H exchanger of sea urchin eggs by phorbol ester. *Nature* 314:274-277.
- SWANSON, W.F.; ROTH, T.L. and WILDT, D.E. 1994. In vivo embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. *Biol Reprod* 51:452-464.
- TALBOT, P.; DiCARLANTONIO, G.; ZAO, P.; PENKULA, J and HAIMO, L.T. 1985. Motile cells lacking hyaluronidase can penetrate the hamster oocyte cumulus complex. *Dev Biol* 108:387-398.

- THADANI, U.M. 1980. A study of hetero-specific sperm-egg interactions in the rat, mouse, and deer mouse using in vitro fertilization and sperm injection. *J Exp Zool* 212(3):435-453.
- VINE, M.F.; TSE, C.K.J.; HU, P.C.; TRUONG, K.Y. 1996. Cigarette smoking and semen quality. *Fertil Steril* 65:835-842.
- WASSARMAN, P. 1987. The biology and chemistry of fertilization. *Science* 235:553-560.
- WATSON, A.J. & BARCROFT, L.C. 2001. Regulation of blastocyst formation. *Front Biosci* 6:708-730.
- WATSON, A.J. & KIDDER, G.M. 1988. Immunofluorescence assessment of the timing of appearance and cellular distribution of Na/K-ATPase during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 126:80-90.
- WATSON, A.J.; NATALE, D.R. and BARCROFT, L.C. 2004. Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci* 82-83:583-592.
- WILEY, L. 1987. Development of the blastocyst: role of cell polarity in cavitation and cell differentiation. In: Bavister, B. (Ed.), *The Mammalian Preimplantation Embryo: Regulation of Growth and Differentiation in vitro*. Plenum Publishing Co. New York, pp. 65-93.
- WILSON, W.L. & OLIPHANT, G. 1987. Isolation and biochemical characterization of the subunits of the rabbit sperm acrossome stabilizing factor. *Biol Reprod* 37:159-169.
- WOLF, D.P. 1978. The block to sperm penetration in zona-free mouse eggs. *Develop Biol* 64:1-10.
- YANAGIMACHI, R. 1970. In vitro acrossome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa by bovine follicular fluid and its fractions. *J Exp Zool* 170:269-280.