

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**AÇÃO REGULATÓRIA DO GnRH NO  
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRECOCE E  
VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES SUÍNOS PELO  
MÉTODO DE MICROGOTA**

**TESE DE DOUTORADO**

**Marcelo Marcos Montagner**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2005**

**AÇÃO REGULATÓRIA DO GnRH NO  
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRECOCE E  
VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES SUÍNOS PELO  
MÉTODO DE MICROGOTA**

**por**

**Marcelo Marcos Montagner**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária.**

**Orientador: Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2005**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**AÇÃO REGULATÓRIA DO GnRH DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRECOCE E VITRIFICAÇÃO  
DE EMBRIÕES SUÍNOS PELO MÉTODO DE MICROGOTA**

elaborada por  
**Marcelo Marcos Montagner**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Paulo Bayard Dias Gonçalves**  
(Presidente/Orientador)

**Alceu Mezzalira, Dr. (UDESC/CAV)**

**Thomaz Lucia Jr., Dr. (UFPEl)**

**Paulo Alberto Lovatto, Dr. (UFSM)**

**João Francisco Coelho de Oliveira, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 06 de maio de 2005.

**Montagner, Marcelo Marcos, 1973-**

**M758a**

Ação regulatória do GnRH no desenvolvimento embrionário precoce e vitrificação de embriões suínos pelo método de microgota / por Marcelo Marcos Montagner ; orientador Paulo Bayard Dias Gonçalves – Santa Maria, 2005.

102 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

1. Medicina veterinária 2. Fisiopatologia de reprodução 3. GnRH 4. Desenvolvimento embrionário 5. SB-75 6. Vitrificação 7. Embriões suínos 8. Microgota I. Gonçalves, Paulo Bayard Dias II. Título

CDU: 619:636.082.454

**Ficha catalográfica elaborada por**

Luiz Marchiotti Fernandes CRB-10/1160  
Biblioteca Setorial do CCR/UFSM

---

© 2005

Todos os direitos autorais reservados a Marcelo Marcos Montagner. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua Sete de Setembro, 325, Dois Vizinhos, PR, 85660-000

Fone (0xx)46 35361225; End. Eletr: [marcelomontagner@hotmail.com](mailto:marcelomontagner@hotmail.com)

---

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela minha existência.

Ao Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves, pela orientação desde a iniciação científica. Aos ensinamentos, respeito profissional, confiança, empatia e amizade que marcaram esses anos.

Ao Dr. Brett Rodger White, co-orientador deste trabalho, pela oportunidade de realizar os experimentos no seu laboratório. Agradeço pela amizade dispensada à minha família e significativa contribuição no meu crescimento como cientista.

Ao Dr. Jairo Pereira Neves por ter confiado e por ter me concedido a oportunidade de realizar esse curso. Ao mestre-orientador pelos anos de convivência e trabalhos com satisfação.

Aos professores e funcionários envolvidos com o Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária pela colaboração durante o curso.

Às pessoas do Animal Science Department pelo apoio, respeito, carinho e educação: Nancy, Ginger, Rebecca, Candy, Andrea, Becky, Ryann, Amy, Jessica, Ben, Rachel, Emily.

Aos amigos de Santa Maria pela força: Bortolotto, Fabiano, Alexandre, Márcia, João Francisco, Fernando, Valério, Patrícia.

Aos amigos de Lincoln, pela ajuda e momentos de alegria: Susan e David, Mr. Morrison, João e Vina, Giovani e Laura, Ricardo e Simone.

Aos animais e pessoas, de todas as épocas, que de uma forma ou de outra contribuíram para o crescimento do conhecimento humano.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante todo o período de realização do curso de doutorado e pela oportunidade de realizar os experimentos fora do país.

Aos cidadãos brasileiros que mantêm a Universidade Federal de Santa Maria, na qual obtive minha formação na área de Medicina Veterinária.

Ao Sandro, Romeu, Aldo, Willians, Sami, Deco, Pato, Joanei, Ninha, Sérgio e Jaime pela amizade.

Aos queridos Cléber e Jonas Montagner e Abo Bin por terem sido exemplos positivos na minha infância e adolescência.

Aos Tios Ari e Dalita, Ladislau e Olga, Jacó e Judite e ao Seu Heitor e a Dona Branca por terem sido os meus segundos pais nos tempos de Curitiba e Santa Maria.

Ao Flávio, Stela, Flávia e Laís por terem me dado fundamental apoio no primeiro ano desse curso.

A todos os familiares pelo incentivo e torcida.

Aos meus irmãos Dulce, Stela e Cléber, pelo carinho e amor entre nós e pelo estímulo positivo que sempre me deram.

Aos meus sogros, Eduardo e Glacy, pela força espiritual que nos protege através da fé em Jesus Cristo.

Aos meus pais, Alcebi e Geni, pelo incentivo e apoio fundamentais para que esse projeto se realizasse. Obrigado pela vida dedicada aos filhos e pelos valores ensinados. Obrigado por terem me dado amor, raízes e asas.

Aos meus dois filhos, Rodrigo e Thiago, pela inspiração, amor, companheirismo e significado em minha vida.

À minha esposa Celia Regina, por ter sido o alicerce dessa jornada; serei eternamente grato pela sua bravura em enfrentar desafios, pelo esforço e dedicação. Pelo AMOR que une a nossa família.

**“Mais importante que ser o primeiro, é ser correto”**

*Dr. Foote*

**“A pior morte é a morte da esperança”**

*Autor desconhecido*

**“Quanto mais o arco se verga, mais longe vai a lança”**

*Gibran*

**“As teorias são cinzentas, verde mesmo só a árvore da vida”**

*Goethe*

**“Há dois dias que nunca existem, o ontem e o amanhã”**

*Dalai Lama*

**“Não saia, é no interior do homem que habita a verdade”**

*Yung*

**“Honestidade, sinceridade, paciência, trabalho, perseverança, amor,  
perdão, respeito ao próximo”**

*Virtudes*

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **AÇÃO REGULATÓRIA DO GnRH NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRECOCE E VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES SUÍNOS PELO MÉTODO DE MICROGOTA**

AUTOR: MARCELO MARCOS MONTAGNER

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de maio de 2005

O objetivo do presente estudo foi investigar a importância do GnRH no desenvolvimento embrionário precoce em camundongos. GnRH-I, GnRH-II e os GnRH agonistas: Des-Gly, Des-Trp e histrelina não incrementaram o desenvolvimento embrionário. Entretanto, o tratamento com SB-75, um antagonista específico do GnRH, bloqueou o desenvolvimento embrionário no estágio de mórula. A inibição do desenvolvimento embrionário pelo SB-75 pôde ser revertida com a adição de histrelina. Para determinar a cascata do sinal intracelular desencadeada pela ligação do GnRH com o seu receptor, embriões foram cultivados na presença de inibidores específicos da PKC (GFX) e da PKA (SQ22536). O inibidor da PKC bloqueou o desenvolvimento embrionário em estágio similar ao bloqueio mediado pelo SB-75, enquanto o SQ22536 teve efeito inibitório diminuindo a formação de blastocisto e taxas de eclosão. Os resultados sugerem que o GnRH tem um efeito autócrino essencial no desenvolvimento embrionário através do GnRHR, provavelmente, ativando a cascata da PKC. Por outro lado, a inibição do sinal do GnRH não ativa mecanismos apoptóticos que envolvam caspase-3. Em outro experimento, foi investigado o desenvolvimento *in vitro* de embriões da raça Meishan (M) e branco cruzado (WC) após vitrificação pelo método microgota. O desenvolvimento de protocolos eficientes para criopreservação de embriões suínos com a zona pelúcida intacta e a avaliação das diferenças entre raças pode ter um significativo impacto na suinocultura. A percentagem de embriões que sobreviveram à criopreservação depois de 24 h foi maior na M (72%) do que na WC (44%). No entanto, o desenvolvimento *in vitro* dos embriões que sobreviveram à criopreservação não foi diferente entre M e WC nos estádios de blastocisto expandido (64%) ou eclodido (22%). Os índices de desenvolvimento foram significativamente mais altos para os embriões controle do que para os embriões vitrificados nas duas raças no estágio de blastocisto expandido, porém não foram diferentes para o estágio de blastocisto eclodido. A formação de blastocisto expandido não diferiu entre os embriões controle M e WC (98 e 95%, respectivamente). Com o novo procedimento (“hot warm”) para descongelar embriões vitrificados pelo método de microgota, pode-se aumentar dos índices de sobrevivência. Os melhores estádios embrionários para a vitrificação de embriões suínos variam de mórula compacta tardia até blastocisto expandido inicial. Os resultados sugerem que embriões M têm mais capacidade de sobreviver ao processo de vitrificação do que embriões WC.

Palavras-chaves: GnRH, desenvolvimento embrionário, SB-75, vitrificação, embriões suínos, microgota.



## ABSTRACT

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **ROLE OF GnRH DURING EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT AND DEVELOPMENT OF SWINE EMBRYOS FOLLOWING VITRIFICATION BY MICRODROPLET METHOD**

AUTOR: MARCELO MARCOS MONTAGNER  
ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de maio de 2005

The objective of this study was to investigate the role of GnRH on the preimplantation development of mouse embryos *in vitro*. GnRH-I, GnRH-II, and GnRH agonists: Des-Gly, Des-Trp and histrelin did not improve embryo development. However, treatment with the specific GnRH antagonist SB-75 blocked embryo development at morula stage. The inhibition of embryo development by SB-75 could be rescued by the addition of histrelin. To determine which intracellular signaling cascade is involved following binding of GnRH to the GnRHR, embryos were cultured in the presence of specific PKC (GFX) or PKA (SQ22536) inhibitors. The PKC inhibitor blocked embryo development at a similar stage as SB-75, whereas SQ22536 had an inhibitory effect, diminishing blastocyst formation and hatched rates. There are evidences that GnRH has an essential autocrine effect on mouse embryonic development via GnRHR, probably by activating PKC signaling cascade while the inhibition of the GnRH signaling does not activate apoptotic mechanisms involving caspase-3. In another experiment, development *in vitro* of embryos from Chinese Meishan (M) and occidental white crossbred (WC) females were investigated after improving the vitrification protocol for pig embryos. Efficient cryopreservation of zona pellucida-intact porcine embryos and studies of the difference among breeds could greatly impact the swine industry. The percentage of embryos surviving 24 h after cryopreservation without lysis or degeneration was higher for M (72%) than WC (44%). However, *in vitro* development of embryos that survived cryopreservation was not different between M and WC at the expanded (64%) or hatched (22%) blastocyst stages. Developmental rates were significantly higher for control embryos than frozen embryos from both breeds at expanded blastocyst stage, but not at hatched blastocyst stage. Rates of expanded blastocyst formation did not differ between M and WC control embryos (98 and 95%, respectively). With a new procedure to warm vitrified pig embryos, the survival rates may be improved. The optimal stages to vitrify pig embryos using the microdroplet method ranges from late compact morula to early expanded blastocyst. The results suggest that M embryos have a higher capacity to survive the vitrification process than WC embryos.

Key words: GnRH, embryonic development, SB-75, vitrification, swine embryos, microdroplet.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 GnRH no desenvolvimento embrionário precoce.....	10
1.2 Criopreservação de embriões suínos.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 GnRH no desenvolvimento embrionário precoce.....	12
2.2 Criopreservação de embriões suínos.....	17
3. CAPÍTULO 1: Role of gonadotropin-releasing hormone on mouse preimplantation embryonic development.....	20
4. CAPÍTULO 2: Comparison of development <i>in vitro</i> between Meishan and white crossbred swine embryos after vitrification by microdroplet method.....	55
5. DISCUSSÃO.....	76
5.1 GnRH no desenvolvimento embrionário precoce.....	76
5.2 Vitrificação de embriões suínos.....	79
6. CONCLUSÃO.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 GnRH no desenvolvimento embrionário precoce

Historicamente, o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é conhecido como componente neuroendócrino chave para a função reprodutiva, atuando no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. No entanto, existem evidências de que o GnRH atua de maneira autócrina/parácrina na regulação do crescimento celular, proliferação e apoptose em diferentes tecidos e células com envolvimento na reprodução.

A primeira evidência de que o GnRH é importante para o desenvolvimento embrionário precoce foi apresentada por SESHAGIRI et al. (1994), demonstrando que embriões de macaco resus secretam GnRH no meio de cultivo *in vitro* durante as fases de pré- e peri-implantação e embriões eclodindo e eclodidos expressam a proteína do GnRH. Posteriormente, foi detectado o mRNA e a proteína do GnRH, bem como expressão gênica do GnRHR em embriões de camundongos (RAGA et al., 1999) e humanos (CASAÑ et al., 1999). A morte celular programada, apoptose, é um fenômeno que, quando desencadeado, pode levar os embriões à morte. O efeito do GnRH sobre apoptose em embriões em fase de pré-implantação não foi ainda estudado.

Com base nesses estudos, a hipótese foi de que o GnRH é importante para o desenvolvimento embrionário, atuando de maneira autócrina e parácrina usando seu receptor e ativando as cascatas da PKC e/ou PKA, sendo o sinal do GnRH importante para a inibição da apoptose em embriões. Os objetivos foram estudar o efeito da adição de GnRH-I, GnRH-II, Des-Gly, Des-Trp e histrelina sobre o desenvolvimento de embriões de camundongos; verificar se existe efeito negativo do antagonista do GnRH, SB-75, sobre o desenvolvimento embrionário precoce; avaliar em que momento do desenvolvimento embrionário o sinal do GnRH é importante; investigar se o GnRH atua via seu receptor, GnRHR, em embriões; determinar a importância dos sinais intracelulares da PKC e PKA sobre o desenvolvimento embrionário precoce em camundongos e analisar se o bloqueio do sinal do GnRH, produzido pelo SB-75, desencadeia apoptose em embriões de camundongo. Estudos sobre a fisiologia do desenvolvimento embrionário precoce são de fundamental importância, pois esse conhecimento gerado tem impacto na produção de embriões *in vitro*, clonagem, animais

transgênicos, células tronco, bem como na clínica da reprodução em humanos, como exemplo, a criação de novos métodos anticoncepcionais.

## 1.2 Criopreservação de embriões suínos

A população suína mundial é estimada em 940 milhões e grande parte da população humana tem a carne de suíno como importante fonte de proteína. A criopreservação eficiente de embriões, com zona pelúcida intacta, pode ter importante papel na indústria suinícola, pois pode servir como ferramenta para formação de bancos de germoplasma e prover maior biosegurança na transferência de material genético. Há um interesse em se estudar as diferenças entre os suínos da raça chinesa Meishan e animais de raças ocidentais, pois suínos Meishan apresentam características muito peculiares, as quais podem ser incorporadas na criação por cruzamento ou, em um futuro próximo, pela engenharia genética.

Em suíno, não existe uma técnica eficaz para se criopreservar embriões porque os embriões suínos são muito mais sensíveis à congelação do que embriões de outras espécies de interesse econômico ou de animais de laboratório. Dentre as várias metodologias para se criopreservar embriões, a vitrificação é a mais indicada para suínos, pois essa técnica já permitiu a produção de leitões vivos e normais. No entanto, a maioria das metodologias empregadas envolve micromanipulação, estabilização do citoesqueleto, ou vitrificação de embriões em estádios nos quais a zona pelúcida não está mais intacta. Nesse sentido, MISUMI et al. (2003) demonstraram a viabilidade de se vitrificar embriões com zona pelúcida intacta pelo método de microgota. Os objetivos do presente estudo foram determinar a eficiência desse método e avaliar as diferenças entre embriões suínos cruzados branco e Meishan quanto ao desenvolvimento *in vitro* depois da vitrificação, quanto ao efeito de dois métodos de aquecimento após vitrificação e quanto à influência do estágio embrionário no momento da vitrificação em microgota sobre os índices de sobrevivência. O estudo das diferenças entre a raça Meishan e cruzado branco quanto à tolerância à criopreservação podem auxiliar no entendimento de fatores que influenciam na sobrevivência após esse processo, com importância na formação de bancos de germoplasma e na transferência de embriões.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GnRH no desenvolvimento embrionário precoce

Em humanos, a sobrevivência embrionária é um componente crítico para a reprodução, sendo que a perda embrionária antes da implantação é ao redor de 20-25%. Essas perdas representam um problema substancial para a fecundação *in vitro* e para a clínica de assistência reprodutiva e são atribuídas a falhas na formação dos blastômeros e desenvolvimento do endométrio. A redução dessas perdas pode aumentar a eficiência das tecnologias reprodutivas, resultando em mais gestações, menor índice de múltiplos nascimentos e menores custos com esses processos. Por outro lado, a identificação de elementos essenciais para a fecundação e desenvolvimento embrionário podem levar ao desenvolvimento de métodos anticoncepcionais alternativos não esteróides.

Em animais domésticos, principalmente em bovinos, suínos e ovinos, falhas na fecundação e mortalidade embrionária representam um prejuízo significativo no sistema de produção. Em bovinos, os índices de repetição de estro, após monta natural ou inseminação artificial, estão entre 10 e 40%, com médias de 25% (para revisão: AYALON, 1978). Além disso, biotécnicas, como a produção de embriões *in vitro* (PIV), têm exercido um papel importante como ferramenta de multiplicação de material genético. A PIV também é uma etapa fundamental para a produção de animais transgênicos e clones. Essa biotecnologia está bem desenvolvida e implantada, porém ainda há uma série de limitações e falta de conhecimento para que o processo de desenvolvimento embrionário *in vitro* atinja níveis similares ao desenvolvimento *in vivo* tanto em quantidade quanto em qualidade dos embriões. A interação entre o ambiente uterino e o concepto é um fenômeno muito sutil e que possui vários fatores envolvidos: como água, temperatura, atmosfera, pH e substâncias bioquímicas: como aminoácidos, carboidratos, proteínas, glicoproteínas, hormônios, vitaminas e fatores de crescimento. Vale ressaltar que esse ambiente é muito dinâmico e varia com muita rapidez de acordo com uma delicada relação entre embriões - fluido uterino – útero, mediada por efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos.

Historicamente, o GnRH é conhecido como componente neuroendócrino chave para a função reprodutiva. Após a sua liberação do hipotálamo, o GnRH se liga ao GnRHR na superfície das células gonadotróficas da glândula pituitária anterior (CONN, 1981; CLAYTON & CATT, 1981). Essa interação estimula a síntese e secreção de FSH e LH, os

quais são responsáveis pelo recrutamento folicular e ovulação na fêmea (HSUEH & JONES, 1981; CLARKE et al., 1983). Os sinais intracelulares ativados pela ligação do GnRH com o seu receptor nos gonadotrófos incluem PKC, PKA e múltiplas cascatas da MAPK (STOJILKOVIC et al., 1994; HARRIS et al., 2002; VASILYEV et al., 2002). Em contraste com a predominante localização no sistema nervoso central, ambos genes do GnRH e GnRHR são expressos em vários tipos de tumores e nos seguintes tecidos reprodutivos: ovário (BAUER-DANTOIN & JAMESON, 1995; MINARETZIS et al., 1995; KANG et al., 2001), endométrio (CASAÑ et al., 1998), placenta (RAMA & RAO, 2001), seio (KAKAR et al., 1992), testículos (KAKAR et al., 1992) e próstata (KAKAR et al., 1992).

Existe evidência de que o GnRH atua de maneira autócrina/parácrina na regulação do crescimento celular, proliferação e apoptose (HSUEH & JONES, 1981; STOJILKOVIC et al., 1994; PENG et al., 1994; OLOFSSON et al., 1995; CASAÑ et al., 1998; ZHAO et al., 2000; MITWALLY & CASPER, 2002; NEILL, 2002). Agonistas e antagonistas do GnRH têm sido amplamente utilizados para estudar o crescimento e proliferação de células tumorais. Em relação a esse assunto, ambos efeitos positivos e negativos dos agonistas do GnRH sobre o crescimento de células cancerígenas têm sido reportados (EMONS et al., 1998). A buserilina, um agonista do GnRH, pode estimular o crescimento de células mamárias da linhagem cancerígena MCF-7 *in vitro* e esse efeito é inibido pelo SB-75 (SEGAL-ABRAMSON et al., 1992). ARENCIBIA & SCHALLY (2000) mostraram que o [D-Trp6] LHRH estimula células de linhagem de câncer ovariano, ES-2, a proliferar; o uso de anticorpo contra GnRH inibe a proliferação de maneira dependente do tempo e da concentração, sugerindo que o GnRH pode funcionar como fator de crescimento autócrino em câncer ovariano. Entretanto, trabalhando com o mesmo tipo de GnRH agonista, PINSKI et al. (1994) observaram que o GnRH inibiu o crescimento de câncer de próstata, R-3327-AT-1, andrógeno independente, *in vivo* e *in vitro*. Triptorelina, outro GnRH agonista, tem efeito antiproliferativo sobre células de linhagem cancerígena de endométrio, ovário e mama em humanos (EMONS et al., 1993; GRUNDKER et al., 2000). XU et al. (2003) mostraram forte evidência de que o GnRH e TGF- $\beta$  participam no crescimento de leiomioma e a regressão do mesmo é influenciada por uma ação cruzada com membros da família de fatores transcripcionais do tipo Smad. Nesse estudo, o GnRH teve um efeito inibitório revertido parcialmente pelo GnRH antagonista (antide). KANG et al. (2000) encontraram um efeito inibitório do (D-Ala<sup>6</sup>)-GnRH sobre o crescimento de células epiteliais da superfície do ovário de humanos, o qual foi revertido pelo antide de forma dependente da concentração e do tempo.

O SB-75, ou cetrorelix, é um dos mais potentes antagonistas do GnRH que se conhece (AYALON et al., 1993; MULLER et al., 1994; REISSMANN et al., 2000). O efeito inibitório do SB-75 foi encontrado sobre a proliferação de células de linhagens tumorais *in vitro* (SEGAL-ABRAMSON et al., 1992; EMONS et al., 1993; KLEINMAN et al., 1994; PINSKI et al., 1994; MANETTA et al., 1995; GRUNDKER et al., 2000; NOCI et al., 2000) e de tumores *in vivo*, independentemente se são esteróides dependentes ou não (RADULOVIC et al., 1993; PINSKI et al., 1994; YANO et al., 1994a; YANO et al., 1994b; JUNGWIRTH et al., 1997; JUNGWIRTH et al., 1998; LAMHARZI et al., 1998b; SZEPESHAZI et al., 1999, CHATZISTAMOU et al., 2001).

O SB-75 se liga ao receptor de GnRH, o qual é do tipo que se conecta com a proteína G (HOFFMANN et al., 2000; MILLAR et al., 2004). O mecanismo exato pelo qual o SB-75 suprime o crescimento de células cancerígenas não está completamente esclarecido. Esse efeito pode ser indireto, pela redução da secreção de hormônios sexuais (ZANELLA et al., 2000), no caso de tumores dependentes de esteróides, ou diretamente, em tumores independentes de esteróides (SRKALOVIC et al., 1990). O mecanismo de ação do SB-75 pode incluir marcada “down-regulation” da expressão da proteína e mRNA para GnRHR e não meramente ocupação dos sítios de ligação do GnRH (SRKALOVIC et al., 1990; HALMOS et al., 1996; LAMHARZI et al., 1998a; KOVACS et al., 2001; KOVACS & SCHALLY, 2001).

Essa “down regulation” parece ser indireta pelo impedimento da indução da expressão do gene GnRHR, efetuado pelo GnRH e diretamente pelo aumento da concentração do receptor no núcleo; esse fenômeno pode ser relacionado com o processo de internalização e translocação subcelular do GnRHR que ocorre em células da hipófise (HALMOS et al., 2000; KOVACS et al., 2001; KOVACS & SCHALLY, 2001; HALMOS & SCHALLY, 2002). Entretanto, em linhagem de células de câncer humano, a inibição do crescimento pelo SB-75 parece ser independente da específica expressão do gene GnRHR (NOCI et al., 2000). Existem, também, alguns estudos sugerindo que a atividade do SB-75 na ação antiproliferativa pode estar associada com a estagnação do ciclo celular na fase G0/G1, relacionada com “down-regulation” do nível do complexo ciclina A-Cdk2, podendo ser atribuído à “up-regulation” dos níveis das proteínas p53 e p21 (TANG et al., 2002). SB-75 pode interferir com a ação autócrina do IGF-II, inibindo o efeito estimulatório dos IGFs sobre o crescimento (HERSHKOVITZ et al., 1993). O SB-75 pode inibir o crescimento de tumores pela diminuição da quantidade de proteína e mRNA de receptores para EGF (PINSKI et al., 1994; YANO et al., 1994a; MORETTI et al., 1996; JUNGWIRTH et al., 1997; MONTAGNANI et al., 1997; JUNGWIRTH et al., 1998; LAMHARZI et al., 1998a;

SZEPESHAZI et al., 1999; CHATZISTAMOU et al., 2001), IGF-I (YANO et al., 1994) e IGF-II (LAMHARZI et al., 1998b) nas células.

Está bem descrito que os sinais intracelulares desencadeados por esses fatores de crescimento envolvem MAPK (HUNTER, 1995; PEARSON et al., 2001). Ainda não está claro se os análogos do GnRH atuam sobre os caminhos da MAPK/ERK pelo estímulo ou inibição do crescimento e proliferação celular, porém, o efeito parece depender da fase e do tipo celular. Foi mostrado que a ativação da MAPK/ERK é importante para o efeito antiproliferativo do GnRH agonista, leuprolide, sobre células de câncer ovariano (KIMURA et al., 1999). Buserilina, GnRH agonista, age sobre células de luteoma e de corpo lúteo normal ativando MAPK/ERK1/2, mas em luteoma, essa ativação ocorre via fosfolipase D e ácido araquidônico e, em células de corpo lúteo normal, é utilizado o caminho tradicional da PLC e PLA<sub>2</sub> (CHAMSON-REIG et al., 2003). Isso vem de acordo com o conceito de que a ativação de receptores que se ligam à proteína G pode estimular a cascata da MAPK/ERK (HUNTER, 1995; PEARSON et al., 2001). Por outro lado, outros trabalhos suportam a idéia de que os análogos de GnRH podem diminuir a ação do EGF na indução da fosforilação da tirosina do receptor de EGF, resultando na “down regulation” do sinal mitogênico do receptor do EGF e da proliferação celular (MORETTI et al., 1996; EMONS et al., 1998; GRUNDKER et al., 2000; GRUNDKER et al., 2001). Todavia, em células de câncer de próstata de humanos, o GnRH agonista inibiu a ação mitogênica do EGF, diminuindo a expressão da c-fos induzido pelo EGF, sem modificação dos padrões de fosforilação da tirosina (MORETTI et al., 1996; MONTAGNANI et al., 1997). Contrariamente, em células LβT2, o GnRH ativa ERK1/2 levando à indução da c-fos e expressão da proteína LHβ (LIU et al., 2002).

Em adição, o GnRH pode ter importante papel no controle do desenvolvimento folicular e ovulação (PENG et al., 1994; OLOFSSON et al., 1995; WHITELAW et al., 1995), atresia folicular (WHITELAW et al., 1995; VIEYRA & HABIBI, 2000), maturação (DEKEL et al., 1988), fecundação (NY et al., 1987; MORALES, 1998; CASAÑ et al., 2000) e desenvolvimento embrionário precoce (FUNSTON & SEIDEL 1995; RAGA et al., 1999; CASAÑ et al., 1999; HERNANDEZ, 2000; ORTMANN et al., 2001).

O mRNA e a proteína do GnRH foram detectados, bem como a expressão gênica do GnRHR, em embriões de camundongos (RAGA et al., 1999) e humanos (CASAÑ et al., 1999). A histrelina, GnRH agonista, teve efeito positivo no desenvolvimento de embriões de camundongos *in vitro* (RAGA et al., 1999). Além disso, embriões de macaco resus secretam GnRH no meio de cultivo, durante as fases de pré- e peri-implantação, e embriões eclodindo e eclodidos expressam a proteína do GnRH (SESHAGIRI et al., 1994). Esses estudos sugerem



um papel necessário do GnRH para o sucesso do desenvolvimento de embriões nos primeiros dias de embriogênese e implantação.

Durante os primeiros dias da embriogênese, múltiplos sinais intracelulares são essenciais para a normalidade do desenvolvimento, incluindo PKC e PKA. Existem 10 PKCs em mamíferos, quatro isoenzimas convencionais ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$ ), quatro recentes ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ /L e  $\theta$ ) e duas atípicas ( $\zeta$  e  $\lambda$ ; NEWTON, 2003). As PKCs convencionais respondem aos sinais do diacilglicerol e ao  $\text{Ca}^{++}$ , as PKCs recentes respondem somente ao sinal do diacilglicerol e as PKCs atípicas não respondem aos sinais de  $\text{Ca}^{++}$  e do diacilglicerol (NEWTON, 2003). A PKC tem sido amplamente estudada durante a maturação do oócito e fecundação, mas a sua função durante o desenvolvimento embrionário precoce não está totalmente esclarecida, porém, parece desempenhar um papel central nessa fase (SOUSA et al., 1996; GALLICANO et al., 1997a; ELIYAHU et al., 2001; CAPCO, 2001). PAUKEN & CAPCO (2000) estudaram a expressão protéica da PKC em oócitos, em embriões 2, 4, 8-célula e em blastocistos. Nesse trabalho, foi demonstrado que a PKC $\alpha$  é expressa em oócitos até embriões 8-célula, mas não está presente em blastocistos. A PKC $\beta$  não foi detectada em nenhuma das fases avaliadas. As proteínas PKC $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$  e  $\lambda$  estão presentes durante todas as fases iniciais do desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Outros estudos mostram um envolvimento de ambas as quinases em importantes processos durante os primeiros dias de desenvolvimento em mamíferos. A PKC está envolvida com a formação de segundo corpúsculo polar (GALLICANO et al., 1997b), remodelamento da teia de filamentos intermediários (GALLICANO & CAPCO, 1995), compactação (OHSUGI et al., 1993; PAUKEN & CAPCO, 1999; PAUKEN & CAPCO, 2000) e formação do blastocisto (STACHECKI & ARMANT, 1996). A PKA pode ter efeito sobre a formação de junções intercomunicantes durante o estágio de mórula compacta (OGAWA et al., 2000) e interação com a ação estimulatória do IGF-I durante o desenvolvimento precoce de embriões (MAKAREVICH et al., 2000). O papel da PKC e PKA durante a fase de pré-implantação embrionária continua pouco conhecido.

O GnRH tem sido relacionado à apoptose em diferentes células e tecidos, às vezes como um fator estimulatório (SRIDARAM et al., 1998; ZHAO et al., 2000; SIFER et al., 2003; ANDREU-VIEYRA et al., 2004; BIFULCO et al., 2004; UEKI et al., 2004; PARBORELL et al., 2005) e outras, como inibitório (KLEINMAN et al., 1994; ENDO et al., 2003; GUNTHERT et al., 2004; MAUDSLEY et al., 2004; CHEN et al., 2005). A ocorrência de apoptose foi identificada em zigotos de camundongos (LIU et al., 1999; LIU & KEEFE,

2000), em oócitos (LOPES et al., 1998) e embriões 2-8-células de humanos (JURISICOVA et al., 1996; JURISICOVA et al., 1998; LEVY et al., 1998; YANG et al., 1998) e em embriões 8-16-células de bovinos (BYRNE et al., 1999). Parece que a apoptose é um mecanismo para eliminação de blastômeros ou de embriões anormais. Embriões normais podem apresentar células apoptóticas logo após o estágio de mórula e há evidências de que a apoptose é um mecanismo essencial para a formação do blastocisto e eliminação de células danificadas (HARDY, 1997). Em camundongos, a expressão gênica para caspase-3 foi detectada em oócitos, embriões 2-células, 8-células e em blastocistos, entretanto, não foi detectada em zigotos (EXLEY et al., 1999).

Os sinais que desencadeiam apoptose são muitos e variam dependendo do tipo celular, mas todos os caminhos apoptóticos parecem determinar a ativação das proteases cisteinil aspartato específicas, mais conhecidas como família das caspases. As caspases clivam as proteínas no ácido aspártico residual. Elas existem como pró-caspases imaturas, as quais precisam ser clivadas para serem ativadas. A atividade das caspases é regulada pela família de proteínas BCL-2 (REED, 1997). Pelo menos 15 membros da família BCL-2 foram identificados e categorizados em dois grupos (EXLEY et al., 1999): aqueles que exercem efeito anti-apoptótico (BCL-2, BCL-W, BCL-X<sub>L</sub>, A1, MCL-1) e aqueles que são pró-apoptóticos (BAX, BAK, BOK, BIK, BLK, HRK, BNIP3, BIM, BAD, BID, BCL-X<sub>S</sub>). A ativação da caspase-3 (CPP32, apopain, YAMA) é considerada a mais importante e última fase na execução da morte celular programada e leva à rápida clivagem de diversas proteínas estruturais e funcionais na célula (ALNEMRI et al., 1994; NICHOLSON et al., 1995; COHEN, 1997; SALVESON & DIXIT, 1997; THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998; CARAMBULA et al., 2002). Portanto, a análise dos níveis de caspase-3 ativada pode prover um método precoce e direto para investigação de ocorrência de apoptose durante o desenvolvimento embrionário precoce.

## **2.2 Criopreservação de embriões suínos**

A busca do aumento da produtividade é constante na indústria suína. Nesse contexto, o aumento do número de leitões desmamados por porca/ano é um índice importante. As raças ocidentais brancas, como o Large White e Landrace, apresentam tamanho de leitegada médio de 11 leitões. Raças chinesas apresentam altíssima prolificidade. Essa característica levou à importação de exemplares dessas raças no final dos anos 80, principalmente, em projetos de

estudo na França e EUA. A raça com maior volume de importação foi a Meishan, mas também vieram animais das raças Fengjing e Minzhu. A raça Meishan se caracteriza por crescimento lento e grande acúmulo de gordura na carcaça; são animais mais resistentes a doenças do que raças brancas ocidentais. Os animais dessa raça possuem alta capacidade de consumo de matéria seca. A raça Meishan talvez seja a mais prolífica do mundo. As fêmeas alcançam a puberdade aos 2,5–3,0 meses de idade, com leitegada numerosa de 17 leitões. Isso se deve em parte aos maiores índices de ovulação, maior capacidade uterina e maiores taxas de sobrevivência embrionária apresentados pela raça Meishan, quando comparada com raças brancas ocidentais (WILMUT et al., 1992; CHRISTENSON, 1993; GALVIN et al., 1993; YOUNGS et al., 1994).

Características de interesse encontradas na raça Meishan podem ser inseridas no rebanho através de cruzamento tradicional, porém, isso pode introduzir no rebanho características indesejáveis de baixa capacidade de desenvolvimento, conversão alimentar ineficaz e baixa qualidade de carcaça. Com avanços na engenharia genética, existe o potencial de criação de animais transgênicos, sendo expressos apenas os genes de interesse. Nesse sentido, a formação de bancos de germoplasma para a preservação desse material genético é de fundamental importância estratégica para próximas gerações. Uma das formas mais eficazes de se preservar germoplasma é a criopreservação de embriões. Sendo assim, a comparação do efeito da criopreservação sobre embriões de diferentes genótipos, pode auxiliar na descoberta de fatores importantes para a sobrevivência à criopreservação em suínos.

Atualmente, não há um método simples, provado e eficaz para se criopreservar embriões suínos com zona pelúcida intacta. Embriões suínos são extremamente sensíveis a baixas temperaturas e à formação de cristais de gelo durante a criopreservação (WILMUT, 1972; POLGE & WILLADSEN, 1978; YOSHINO et al., 1993; POLLARD & LEIBO, 1994). Devido à essa característica, a congelação de embriões suínos apresenta muito menor eficiência do que outras espécies domésticas e de animais de laboratório. O método que tem demonstrado ser o mais promissor para a criopreservação de embriões suínos é a vitrificação, tendo em vista que essa técnica evita a formação de cristais de gelo. Além disso, a baixa de temperatura até o ponto de vitrificação é extremamente rápida, sendo assim, o processo tradicional de queda gradual da temperatura, ocasionando lesões celulares, é evitado (DOBRINSKY, 1997). Durante a vitrificação, há a formação de vidro amorfo no interior da

célula e os embriões não ficam sujeitos aos danos devido à formação de cristais (RALL & FAHY, 1985).

Nos últimos 30 anos, muitas tentativas foram realizadas para congelar embriões de suínos, utilizando sistemas convencionais eficientes para congelação de embriões bovinos e de camundongos. No entanto, a grande maioria dessas técnicas resultou em fracasso por não serem adequadas para a espécie suína. Avanços foram realizados, principalmente, na última década, o que possibilitou a criopreservação de blastocistos eclodindo ou eclodidos (NAGASHIMA et al., 1995a; KOBAYASHI et al., 1998). Porém, nesses estádios de desenvolvimento embrionário a zona pelúcida não está mais intacta, quebrando assim essa barreira biológica que o embrião tem contra bactérias e vírus, fundamental para a manutenção da biosegurança na utilização da transferência de embriões (LEGGE, 1995; STRINGFELLOW & WRATHALL, 1995; WRATHALL, 1995; GUÉRIN et al., 1997; VANROOSE et al., 2000). Foi também demonstrado que é possível vitrificar embriões em estádios mais jovens, desde 4-células (NAGASHIMA et al., 1995b) até blastocisto inicial (DOBRINSKY et al., 1999). Entretanto, nesses trabalhos, foi realizada abertura da zona pelúcida para remoção do conteúdo lipídico resultante de centrifugação; desse modo, essas técnicas não são indicadas em programas de transferência de embriões onde haja preocupação com biosegurança. O método de palheta puxada aberta (open pulled straw, OPS) mais estabilização do citoesqueleto de embriões, com a zona intacta, antes da vitrificação, produziu o nascimento de leitões vivos depois da criopreservação (BERTHELOT et al., 2000; BEEBE et al., 2002). DOBRINSKY et al. (2000) mostraram que esse método aumenta os índices de sobrevivência de embriões eclodindo vitrificados.

Já foi demonstrado que é possível a vitrificação de mórulas compactas suínas, resultando em produção de leitegadas com o uso do método OPS, sem a necessidade de pré-estabilização do citoesqueleto (BERTHELOT et al., 2001). MISUMI et al. (2003), usando modificações no método de microgota previamente descrito para vitrificação de oócitos bovinos (PAPIS et al., 2000), produziram o nascimento de leitões a partir de mórulas compactas e blastocistos iniciais vitrificados. A melhoria desses dois métodos, relativamente simples sem exigência de pré-tratamentos ou manipulações especiais dos embriões com zona pelúcida intacta, parece ser o caminho para se criopreservar embriões de suínos de forma eficaz.

### **3. CAPÍTULO 1**

TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**ROLE OF GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE ON  
MOUSE PREIMPLANTATION EMBRYONIC  
DEVELOPMENT**

**Marcelo M Montagner, Amy R Cropp, Jessica J Swanson, Rebecca A  
Cederberg, Benjamin E Bass, Paulo BD Gonçalves and Brett R White.**

**BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2005**

## (1) Title

### **Role of Gonadotropin-Releasing Hormone on Mouse Preimplantation Embryonic Development**

Key word: GnRH, Embryo, SB-75, PKC, Apoptosis (5 key words)

Marcelo M Montagner<sup>1,2</sup>, Amy R Cropp<sup>1</sup>, Jessica J Swanson<sup>1</sup>, Rebecca A Cederberg<sup>1</sup>, Benjamin E Bass<sup>1</sup>, Paulo BD Gonçalves<sup>2</sup> and Brett R White<sup>1, a</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory of Reproductive Physiology, Department of Animal Science, University of Nebraska, Lincoln, NE – 68583-0908.

<sup>2</sup>Biotechnology and Animal Reproduction Laboratory - Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil – 97115-970.

## (2) Abstract

The interaction between GnRH and its receptor in gonadotropes of the anterior pituitary gland represents a key point for regulation of reproductive function. Besides its established action, there is evidence that extra-pituitary GnRH acts via autocrine/paracrine mechanisms in multiple tissues. Protein for GnRH and mRNA for both GnRH and its receptor have been detected in human endometrium and oviduct as well as in embryos at the morula/blastocyst stage in the mouse and human. The objective of this study was to investigate the importance of GnRH on development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. GnRH-I, GnRH-II, and the GnRH agonists: Des-Gly, Des-Trp and histrelin did not improve embryo development. However, treatment with the specific GnRH antagonist SB-75 blocked embryo

---

<sup>a</sup> Corresponding author: Tel.: 011-1-402-472-6438; *E-mail*: bwhit1@unlnotes.unl.edu  
University of Nebraska, A224j Animal Science, Lincoln – NE – USA, 68583-0908

development. Inhibition of embryo development by SB-75 could be rescued by the addition of the GnRH agonist, histrelin. To determine which intracellular signaling cascades are activated following binding of GnRH to its receptor, we cultured embryos in the presence of specific PKC (GFX) or PKA (SQ22536) inhibitors. The PKC inhibitor blocked embryo development at a similar stage as SB-75, whereas SQ22536 had an inhibitory effect, diminishing blastocyst formation and hatching rates. Western blot analysis showed no difference in protein levels of activated caspase-3 in embryos treated with SB-75 and control, indicating, for the first time, that the inhibition of GnRH signaling does not activate apoptotic mechanisms during the first two cleavages. We suggest that GnRH has an essential autocrine effect on mouse embryonic development via GnRH receptor, probably by activating the PKC signaling cascade.

### **(3) Introduction**

Historically, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is known as a key neuroendocrine component that is essential to reproductive function. The pulsatile release of GnRH from the hypothalamus and its subsequent binding its cognate receptors on the plasma membrane of gonadotropes within the anterior pituitary gland results in the synthesis and secretion of the gonadotropins, follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH)[1, 2]. The signaling pathways activated by the binding of GnRH to its receptor on gonadotropes include PKC, PKA, and multiple MAPK cascades [3 - 5]. Despite the established role of GnRH, it has been detected in numerous other reproductive tissues. Since GnRH is a decapeptide, its ability to travel through the vascular system to remote locations from the hypothalamus without degradation seems unlikely. Therefore, GnRH is likely produced locally in these tissues. There is evidence that GnRH acts in either an autocrine or paracrine manner in the regulation of cellular growth, proliferation [6] and apoptosis [7, 8] In addition, GnRH has important roles in the control of follicular development, ovulation [9, 10],

follicular atresia [10], oocyte maturation, fertilization [11, 12] and early embryonic development [13 – 15]. Expression of both the GnRH and GnRHR genes has been detected in reproductive tissues such as the ovary [16, 17], endometrium [18], placenta [19], breast [16], testis [16], prostate [16] and oocyte [20].

Rhesus monkey embryos in culture secreted GnRH into the medium during the pre- and peri-implantation stages of development and GnRH protein was detected in pre-hatched and hatched embryos [21]. Additionally, both GnRH mRNA and protein and GnRHR gene expression were detected in mouse [14] and human embryos [15]. The GnRH agonist, histrelin, at a concentration of 10  $\mu$ M, had a stimulatory effect on mouse embryonic development *in vitro* [14]. These studies suggest a necessary local role of GnRH in successful preimplantation embryonic development and implantation.

In early embryogenesis, multiple intracellular signaling cascades are involved in normal development. Protein kinase C has been primarily studied during oocyte maturation and fertilization and it appears to have a pivotal role during early days of development [22, 23]. Studies raise the possibility of involvement of both protein kinases, PKC [23 – 25] and PKA [26, 27] in the process of embryo development, but their roles remain to be determined.

GnRH has been associated with apoptosis in different tissues, acting as either a stimulatory [28 – 30] or inhibitory [31 – 33] factor. However, the effect of GnRH on apoptosis in preimplantation embryos has never been studied. Apoptosis has been documented in mouse zygotes [34, 35], human oocytes [36] and 2-8-cell embryos [37 – 39], and bovine 8-16-cell embryos [40] and seems to be a mechanism of elimination of abnormal blastomeres or the whole embryo. Normal embryos can have some apoptotic cells present after the morula stage which seems to be a mechanism essential to the formation of the blastocyst and elimination of damaged cells [41]. Activation of caspase-3 is considered the final execution step of apoptosis and leads to rapid cleavage of diverse structural and



functional proteins in the cell [42, 43]. Caspase-3 gene expression has been detected in mouse oocytes, 2- and 8-cell embryos, and blastocysts, however, it was not detected in zygotes [44]. Therefore, the detection of activated caspase-3 can provide a direct and early measurement of apoptosis during preimplantation embryonic development.

Hence, our goal was to clarify the role of GnRH during early embryogenesis, and its impact on reproduction. We hypothesized that the binding of GnRH to its receptor is important to early embryonic development, acting in an autocrine and/or paracrine manner and stimulating the PKC and/or PKA pathways. Additionally, we addressed whether the inhibition of GnRH signaling can induce apoptosis during early embryogenesis. Our objectives were: 1) determine the effect of GnRH-I, GnRH-II, Des-Gly, Des-Trp and histrelin on early mouse embryonic development, 2) investigate whether a GnRH antagonist has a negative effect on preimplantation embryonic development, 3) investigate if GnRH acts via its receptor in embryos, 4) examine the importance of the PKC and PKA pathways during embryonic development, and 5) identify the effect the influence of GnRH on apoptosis during early embryonic development.

#### **(4) Material and Methods**

##### *Reagents*

The GnRH antagonist, SB-75 {Cetrorelix; [Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>, D-Phe(4Cl)<sup>2</sup>, D-Pal(3)<sup>3</sup>, D-Cit<sup>6</sup>, D-Ala<sup>10</sup>]GnRH in which Ac-D-Nal(2) = *N*-acetyl-3-(2-naphthyl)-D-alanine; D-Phe(4Cl) = 4-chloro-D-phenylalanine; D-Pal(3) = 3-(3-pyridyl)-D-alanine; and D-Cit = D-Citrulline} was synthesized at the University of Nebraska-Lincoln Protein Core Facility. The GF109203X (GFX), phorbol ester (PMA), and SQ22536 were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA) and the histrelin was received from Valera Pharmaceuticals, Inc. (Crambury,

NJ). The eCG, hCG and M2 medium were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

#### *Embryo collection*

Female CBA/C57BL6 mice between 6 to 12 weeks old, maintained at 22 to 24°C with a 12 : 12 LD cycle, were superovulated with I.P. injections of 5 IU eCG and 7.5 IU hCG 48 hours later. After hCG injection, the females were placed overnight with an intact male. Twenty-two hours after the hCG injection, animals were examined for vaginal plugs and sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation and cervical dislocation according to protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Oviducts were removed and washed in M2 medium. The embryos were obtained by rupture of oviductal ampula. Cumulus cells were removed by incubation of the embryos in M2 containing 0.5 µg hyaluronidase/mL for 3 minutes. The zygotes were then washed 4 times to remove the hyaluronidase.

#### *Embryo culture system*

The 1-cell embryos (n = 20 to 40) were cultured in 50 µl drops at 37°C under mineral oil in a humidified 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere. The long-term culture medium was KSOM [45] plus essential (50x, 10µl/ml) and non-essential (100x, 5µl/ml) amino acids. The media was changed every 12 h in all the experiments. The embryos were scored daily for developmental stage and cultured for a total of 144 h. The percentage of embryos developing to the 8-cell (48 hours of culture), compact morula (72 h), blastocyst (96 h), hatching blastocyst (120 h) and hatched blastocyst (144 h) stages were determined based on the number of 2-cell embryos in each group.

#### *Effect of GnRH on early embryonic development*

First we allocated embryos to three treatments ( $n = 40/\text{trt}$ ), control, 10  $\mu\text{M}$  GnRH (GnRH-I) or 10  $\mu\text{M}$  GnRH-II, a recently identified variant of GnRH. Secondly, we used control ( $n = 30$ ), 10  $\mu\text{M}$  GnRH ( $n = 26$ ), 10  $\mu\text{M}$  Des-Gly ( $n = 30$ , GnRH agonist) or 10  $\mu\text{M}$  Des-Trp ( $n = 28$ , GnRH agonist).

#### *Effect of SB-75 on early embryonic development*

We tested different concentrations of SB-75 (GnRH antagonist,  $n = 22/\text{trt}$ ), in order to examine its effect on preimplantation embryos plus identify the minimal concentration with the capacity to inhibit embryo development. The concentrations used were 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, and 10  $\mu\text{M}$ . Next, our goal was to determine the stage at which the SB-75 treatment first started to have a negative effect on embryo development. In order to address this, we cultured embryos ( $n = 37/\text{trt}$ ) with or without 10  $\mu\text{M}$  SB-75, beginning at different times of embryo culture 0, 6, 18, 30, and 42 h, respectively. To verify if the effect of SB-75 was mediated by its receptor, we tried to reverse the inhibitory effect of SB-75 by culturing embryos with 10  $\mu\text{M}$  SB-75 alone ( $n = 32$ ) or in incubation with either 10  $\mu\text{M}$  GnRH-I ( $n = 33$ ), 10  $\mu\text{M}$  Des-Gly ( $n = 32$ ) or 10  $\mu\text{M}$  Des-Trp ( $n = 37$ ). Untreated control embryos were also included in this experiment ( $n = 35$ ). With these treatments, it was not possible to reverse the negative effect of SB-75. With that result, we decided to use a stronger GnRH agonist, histrelin, to challenge SB-75. In this trial, our treatment groups ( $n = 25$  to  $30/\text{trt}$ ) were: control, 10  $\mu\text{M}$  histrelin, 10  $\mu\text{M}$  SB-75 plus 1 or 10  $\mu\text{M}$  histrelin, or 10  $\mu\text{M}$  SB-75 alone. Each time we changed plates, the embryos were exposed 1 hour to histrelin alone before the addition of SB-75, in order to give to histrelin the opportunity to bind first the GnRHR.

#### *Importance of PKC and PKA in early embryonic development*

The traditional signaling pathways activated by GnRH involve both PKC and PKA.

We wanted to determine if there was a linkage between GnRH and these kinases during embryonic development. In order to identify the role of PKC in embryo development, we used different concentrations of GF109203X, a PKC inhibitor [0, 0.1, 1, and 10  $\mu$ M (n = 33 to 35/trt)]. Similarly, we used a PKA inhibitor, SQ22536, at different concentrations 0, 0.01, 0.1, 0.5, and 1 mM (n = 17/trt) to examine the role of PKA in early embryogenesis.

#### *Western immunoblotting analysis*

We examined protein levels of cleaved caspase-3 to determine if apoptotic pathways were activated following blockage of GnRH signaling in 2-4-cell stage embryos by SB-75. Mouse embryos were culture in the presence or absence of 10  $\mu$ M SB-75. The media was changed every 12 hours. Ten embryos for each treatment were left in culture to serve as culture control. Approximately 200 embryos (2 and 4-cell) were harvested at 36 hours of culture, washed in 6 drops with 200  $\mu$ l of PBS 0.1% polivynil pirriolidone (PVP) and transferred to 30  $\mu$ l of sample buffer [60 mM Tris-Cl (pH 6.8), 10% glycerol (v/v), 2% sodium dodecyl sulphate (SDS, w/v), 1%  $\beta$ -mecaptoethanol (v/v), 0.001% bromophenol blue (v/v) and 1% protease inhibitor cocktail (v/v, Sigma, St Louis, MO)]. The samples were vortexed for 2 seconds, submitted to a fast centrifugation and boiled for 8 min. The samples were stored at  $-80^{\circ}$ C until use. Each sample (30  $\mu$ l) was subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel eletrophoresis (PAGE) as previously described by Laemmli [46] and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

The membranes were washed once for 5 min in TBS (pH 7.6, 2.42 g Tris base, 8 g NaCl for liter) and blocked for 1 hour at room temperature in TBS-T (TBS plus 0.1% tween-20) with 5% w/v nonfat dry milk. After the membranes were washed 3 times in TBS-T and incubated overnight at  $4^{\circ}$ C with rabbit monoclonal antibody specific for the two large fragments (19 and 17kDa) of activated caspase-3 (8G10, cat. # 9665, Cell Signaling

Technology, Inc., Beverly, MA). The antibody was diluted 1:1,000 in TBS-T with 5% w/v nonfat dry milk. After incubation, the membranes were washed 3 times in TBS-T and incubated for 1 h with Alexa Fluor 680-labeled goat anti-rabbit IgG secondary antibody (A21076, Molecular Probes Inc., Eugene, OR) diluted 1:10,000 in Odyssey blocking solution (J0752, Li-Cor, Lincoln, NE) with 0.2% Tween-20. The blots were then washed 3 times with TBS-T and once with TBS. The immunoreactive blots were detected and analyzed for relative protein density using an Odyssey infrared imaging system (Li-Cor, Lincoln, NE). Two replications were performed and the abundance of cleaved caspase-3 in the blots was normalized by the number of embryos in each sample.

#### *Statistical analysis*

The statistical analysis of the data from the embryo development experiments was performed using a  $\chi^2$  test in the CATMOD procedure of the SAS program [47]. The percentages at different stages were compared between groups and statistically significant difference was considered if  $P < 0.05$ .

## **(5) Results**

#### *Effect of GnRH on early embryonic development*

In an effort to elucidate the role of GnRH on early embryogenesis, the rates of development to the morula, blastocyst and hatched blastocyst stages were evaluated following treatment with GnRH-I, GnRH-II, Des-Gly, or Des-Trp. There were no differences detected between control and treated embryos for development to the morula, blastocyst and hatched blastocyst stages (Figure 1 and 2).

#### *Effect of SB-75 on early embryonic development*

Treatment with 10  $\mu$ M of SB-75 blocked embryonic development at the compact morula stage (Figure 3). The inhibition occurred in the first 42 hours of embryo culture (Figure 4). GnRH-I, Des-Gly and De-trp could not reverse this inhibitory effect (Figure 5). However, treatment with histrelin was able to rescue blastocyst formation in the presence of SB-75. Further, histrelin alone did not improve embryo development (Figure 6 and 7).

#### *Importance of PKC and PKA in early embryonic development*

The PKC inhibitor, GFX, at a concentration of 10  $\mu$ M totally blocked embryonic development at the morula stage (Figure 8) and the PKA inhibitor, SQ 22536, had an inhibitory effect on hatched blastocyst formation directly proportional to the increasing concentration of inhibitor from 0.01 to 1mM (Figure 9). The SB-75 inhibition of embryonic development has a profile similar to the inhibition by PKC inhibitor.

#### *Effect of SB-75 on embryonic apoptosis in mice*

Treatment with 10  $\mu$ M SB-75 did not increase protein levels of activated caspase-3 compared to controls (Figure 10). The embryos left in culture for control of development had a hatched blastocyst rate of 60% in the control group and embryonic development was blocked at the morula stage in the treatment group.

## **(6) Discussion**

There are many factors that have an essential role during the early days of embryogenesis in mammals and there is strong evidence that GnRH may be an important paracrine/autocrine factor during this period development [14, 18 - 21, 48]. We decided to examine the effect of GnRH and its agonists by treating with GnRH-I and GnRH-II based on previous work with histrelin [14], which showed a positive effect on embryonic development.

The media were changed each 12 hours during the experiments in order to avoid GnRH degradation in the culture system [49]. After failure to improve embryonic development with these two hormones, we cultured embryos in the presence of different GnRH agonists. In the present study, the paracrine effect of GnRH on early mouse embryonic development was not confirmed, because we did not find improvement in blastocyst formation in embryos cultured in the presence of GnRH-I, GnRH-II, Des-Gly, Des-trp, or histrelin, therefore, a paracrine mechanism is unlikely. Nevertheless, an autocrine mechanism was still possible, because embryos contain GnRH [14, 15, 21] and can secrete it into the culture medium [21].

To test this hypothesis, we cultured embryos in the presence of SB-75, or cetrorelix, one of the most potent, specific GnRH antagonists documented [50 – 52]. Whether embryos produce and secrete GnRH they can stimulate their own development or that of the neighboring. Using a GnRH antagonist we could block this autocrine effect. We chose SB-75 as a GnRH antagonist, because it binds specifically to the G protein-coupled GnRH receptor [52, 53] and inhibits proliferation of tumor cell lines [54, 55] and in tumors *in vivo*, independent whether the tumors were steroid dependent or not [56, 57]. We believed that SB-75 could act similarly in embryos as in tumor cells because these cells both express the GnRH receptor and the action of this GnRH antagonist is mediated by specific binding to that receptor [58].

The present results show that SB-75 can block early embryonic development during the first 42 hours of development. Concentrations lower than 10  $\mu$ M did not show an inhibitory effect. However, this result is not surprising since previous *in vitro* studies with GnRH antagonists were effective at inhibiting tumor cell growth [54, 55] and spermatozoon binding to the zona pellucid [12] at concentrations up to 10  $\mu$ M. Why SB-75 acts to block embryonic development just before 42 hours and not after is a question that remains unanswered. However, in this report we begin to investigate GnRH signaling events that

occur in the first 2 days of embryonic development. The SB-75 action takes some time, more than 24 hours, to show an effect, because the earlier we started the treatment the stronger was the blockage of 8-cell, morula or blastocyst formation. To certify that the effect of SB-75 was receptor mediated, we used three GnRH analogs, GnRH-I, Des-Gly, and Des-trp, in an attempt to rescue SB-75 inhibition. However, none of them could rescue embryonic development. Our hypothesis was that SB-75 had a higher affinity for the GnRHR than these GnRH analogs [49, 52]. Therefore, we decided to use the GnRH superagonist, histrelin. Histrelin was strong enough to compete with SB-75 and we rescued development of the embryos treated with SB-75, showing that the effect is likely via GnRH receptor.

More studies are needed to determine the mechanism by which SB-75 blocks embryonic development, however we can use the effect of SB-75 in other models to find explanations and guidance for future studies. The mechanism of action of SB-75 can include a marked down-regulation of GnRHR mRNA and protein, in addition to occupancy of binding sites [59, 60]. This down regulation appears to be both indirect, by counteracting the induction GnRHR gene expression by GnRH, and direct, by the increase of receptor concentration in the nuclei. These phenomena are related to the internalization and subcellular translocation of GnRHR in pituitary cells [60, 61]. Tang et al. [62] observed that SB-75 stop cell cycle progression in the G0/G1 phase, coupled with down-regulation of cyclin A-Cdk2 complex level. Therefore, other possible effect of the SB-75 to block embryonic development is its association with cell cycle arrest at the first cleavage stages.

There is strong evidence that GnRH signaling can influence growth factor mechanisms. SB-75 can interfere with the autocrine action of IGF-II by directly inhibiting the stimulatory effect of IGFs on growth [63], and can inhibit tumor growth by dropping the quantity of EGF [64 – 66] and IGF-I receptor [7] mRNA and protein levels in cells. MAP kinase pathways stimulated by these growth factors are well described and it is know that G



protein-coupled receptor activation can stimulate MAPK/ERK signaling [67, 68]. Growth factors, such as EGF and IGF-I, have an important role in embryonic development [69 – 71]. Questions still remain regarding the effect of SB-75 on embryonic development. Does SB-75 bind to GnRHR avoiding GnRH action or is there down-regulation of the GnRHR protein and mRNA expression? Does SB-75 arrest the cell cycle progression during the first cleavage stages? Is the SB-75 effect involved with growth factor and MAPK/ERK signaling? One or more of the factors described above can be involved in the blockade of GnRH signaling during embryonic development.

The traditional signaling pathways activated by GnRH involve PKC and PKA [3]. We were interested in verifying which pathway is activated by GnRH during early embryogenesis. The role of PKC and PKA during early embryonic development is largely unknown and few reports exist [22, 23]. In our study, the PKC inhibitor blocked embryonic development at the morula stage. This result was in concordance with previous work showing the importance of PKC on second polar body formation [23], remodeling intermediate filament networks [24], compaction [25], and blastocyst formation [72]. Using a PKA inhibitor, blastocyst formation and hatched rates were diminished. Other reports have identified a role for PKA in optimized gap junction formation [27] and in IGF-I mechanisms [26] during embryonic development. In the present research, both protein kinases, PKC and PKA, showed essential importance to normal embryonic formation. However, when we compare the effects of the PKC and PKA inhibitors on embryogenesis with those of SB-75, the inhibition profiles were more similar between SB-75 and the PKC inhibitor. Pauken & Capco [73] studied PKC protein expression during early embryonic development, from oocytes to blastocysts. They showed that PKC $\alpha$  is expressed in oocyte to 8-cell embryo, however it is not present in blastocyst stage. The PKC $\beta$  was not detected in any stage. The proteins PKC $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$  e  $\lambda$  are present during all initial stages of embryonic development

evaluated. Thus, it is more probable that GnRH activates the PKC pathway, and not PKA, following binding to its receptor in early embryos.

GnRH has been associated with apoptosis in different tissues. Consistent with this, we investigated if the inhibition of embryonic development by SB-75 was due to apoptotic signaling pathways. Apoptosis is a phenomenon that occurs naturally in embryos and can lead to embryonic death [36 – 40]. We chose to examine activated caspase-3 protein levels because gene expression profiles for this protein during early embryonic development have been reported [44] and all apoptotic pathways appear to terminate in the activation of the caspase family of proteases with caspase-3 being a major executioner of programmed cell death [42, 43, 74]. In our study, we did not find a difference between in protein levels of activated caspase-3 in embryos treated with SB-75 compared to controls. Therefore, the blockade of embryonic development by SB-75 is executed via another mechanism, possibly by alterations to proteins involved with the cell cycle.

Based on previous studies and our results, we propose a model for the mechanism of action of GnRH inside the oviduct during the first days of embryogenesis (Figure 11). Based on the fact that GnRH and its analogues are not stimulatory to embryonic development *in vitro*, the paracrine effect of GnRH between oviduct and embryos is unlikely. However, an autocrine effect during the first 2 days of life is essential for normal embryonic development. This effect may be due to the action of GnRH on the same blastomere from which it was secreted, neighboring blastomeres or cells from other embryos. This mechanism is mediated by activation of the PKC pathway following GnRH binding to its receptor. Cell cycle, proliferation and compaction could be directly influenced by signaling interaction between GnRH and growth factor mechanisms.

Based on our study, the addition of GnRH or its agonists to the embryo culture medium is unable to improve embryonic development. However, the idea of creating a new

non-steroid contraceptive method based on a GnRH antagonist is exciting. This new method could be used as an optional program to substitute or be used in conjunction with traditional steroid pills, impacting the control of reproduction in millions of humans. In conclusion, our results suggest that GnRH has an essential autocrine effect on embryonic development, activating the PKC signaling cascade following interaction with its receptor and inhibition of GnRH signaling does not activate apoptotic mechanisms involving caspase-3.

### **(7) Acknowledgments**

Funding for Marcelo M Montagner provided by CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Ministério da Educação, Brazil.

### **(8) References**

1. Clayton RN, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocrine Rev* 1981; 2:186-209.
2. Clarke IJ, Cummins JT, Kretser DM. Pituitary gland function after disconnection from direct hypothalamic influences in the sheep. *Neuroendocrinology* 1983; 36:376-384.
3. Stojilkovic SS, Reinhart J, Kvin JC. Gonadotropin releasing hormone receptor: Structure and signal transduction pathways. *Endocrine Rev* 1994; 15(4):462-499.
4. Harris D, Bonfil D, Chuderland D, Kraus S, Seger R, Naor Z. Activation of MAPK Cascades by GnRH: ERK and Jun N-Terminal Kinase Are Involved in Basal and GnRH-Stimulated Activity of the Glycoprotein Hormone LH $\beta$ -Subunit Promoter. *Endocrinology* 2002; 143:1018-1025.

5. Vasilyev VV, Lawson MA, Dipaolo D, Webster NJG, Mellon PL. Different Signaling Pathways Control Acute Induction versus Long-Term Repression of LHB $\beta$  Transcription by GnRH. *Endocrinology* 2002; 143:3414-3426.
6. Hsueh AJW, Jones PBC. Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinol Rev* 1981; 2(4):437-455.
7. Yano T, Yano N, Matsumi H, Morita Y, Tsutsumi O, Schally AV, Taketani Y. Effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogs on the rat ovarian follicle development. *Horm Res* 1997; 48:35-41.
8. Zhao S, Saito H, Wang X, Saito T, Kaneko T, Hiroi M. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist on the incidence of apoptosis in porcine and human granulosa cells. *Gynecol Obstet Investig* 2000; 49:52-56.
9. Olofsson JI, Conti CC, Leung PC. Homologous and heterologous regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in preovulatory rat granulosa cells. *Endocrinology* 1995; 136:974-980.
10. Whitelaw PF, Eidne KA, Sellar R, Smith CD, Hillier SE. Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the rat ovary. *Endocrinology* 1995; 136:172-178.
11. Morales P. Gonadotropin-releasing hormone increases ability of the spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Biol Reprod* 1998; 59:426-430.
12. Morales P, Pasten C, Pizarro E. Inhibition of and in vitro fertilization in rodents by gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Biol Reprod* 2002; 67: 1360-1365.
13. Funston RN, Seidel JR. Gonadotropin-releasing hormone increases cleavage rates of bovine oocytes fertilized in vitro. *Biol Reprod* 1995; 53:541-545.

14. Raga F, Casañ EM, Kruessel J, Wen Y, Bonilla-Musoles F, Polan ML. The role of gonadotropin releasing hormone in murine preimplantation embryonic development. *Endocrinology* 1999; 140:3705-3712.
15. Casañ EM, Raga F, Polan ML. GnRH mRNA and protein expression in preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:234-239.
16. Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, Sellers JC, Neill JD. Cloning, sequencing and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189(1):289-295.
17. Kang SK, Tai CJ, Nathwani PS, Leung PCK. Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 2001; 142(1):182-192.
18. Casañ EM, Raga F, Kruessel JS, Wen Y, Nezhat C, Polan ML. Immunoeractive gonadotropin-releasing hormone expression cycling human endometrium in fertile patients. *Fertility and Sterility* 1998; 70(1):102-106.
19. Rama S, Rao AJ. Embryo implantation and GnRH antagonist, the search for the human placental GnRH receptor. *Hum Reprod* 2001; 16(2):201-205.
20. Dekel N, Lewysohn O, Ayalon D. Receptor for GnRH is present in rat oocytes. *Endocrinology* 1988; 123:1205-1207.
21. Seshagiri PB, Teresawa E, Hearn JP. The secretion of gonadotropin-releasing hormone by peri-implantation embryos of the rhesus monkey: comparison with the secretion of chorionic gonadotropin. *Hum Reprod* 1994; 9:1300-1307.
22. Sousa M, Barros A, Tesarik J. Developmental changes in calcium dynamics, protein kinase C distribution and endoplasmatic reticulum organization in human preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(12):967-977.

23. Gallicano GI, Mc Gaughey RW, Capco DG. Activation of protein kinase C after fertilization is required for remodeling the mouse egg into the zygote. *Mol Reprod Dev* 1997; 46(4):587-601.
24. Gallicano GI, Capco DG. Remodeling of the specialized intermediate filament network in mammalian eggs and embryos during development: regulation by protein kinase C and protein kinase M. *Curr Top Dev Biol* 1995; 31:277-320.
25. Pauken CM, Capco DG. Regulation of Cell Adhesion During Embryonic Compaction of Mammalian Embryos: Roles for PKC and  $\beta$ -Catenin. *Mol Reprod Develop* 1999; 54:135-144.
26. Makarevich A, Sirotkin A, Chrenek P, Bulla J, Hetenyi L. The role of IGF-I, cAMP/protein kinase A and MAP-kinase in the control of steroid secretion, cyclic nucleotide production, granulosa cell proliferation and preimplantation embryo development in rabbits. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 73(3-4):123-133.
27. Ogawa H, Oyamada M, Mori T, Mori M, Shimizu H. Regulation of gap junction formation to phosphorylation of connexin43 in mouse preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 2000; 55(4):393-398.
28. Sridaram R, Hisheh S, Dharmarajan AM. Induction of apoptosis by a gonadotropin-releasing hormone agonist during early pregnancy in the rat. *Apoptosis* 1998; 3(1):51-57.
29. Andreu-Vieyra CV, Buret AG, Habibi HR. Gonadotropin-releasing hormone induction of apoptosis in the testes of goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 2004; 146 (3):1588-1596.
30. Parborell F, Irusta G, Vitale A, Gonzalez O, Pecci A, Tesone M. Gonadotropin-releasing hormone antagonist antide inhibits apoptosis of preovulatory follicle cells in rat ovary. *Biol Reprod* 2005; 72(3):659-666.

31. Kleinman D, Douvdevani A, Schally AV, Levy J, Sharoni Y. Direct growth inhibition of human endometrial cancer cell by the gonadotropin-releasing hormone antagonist SB-75: role of apoptosis. *Amer J Obst Gynecol* 1994; 170:96-102.
32. Gunthert AR, Grundker C, Bottcher B, Emons G. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) inhibits apoptosis induced by cytotoxic agent UV-light but not apoptosis mediated through CD95 in human ovarian and endometrial cancer cells. *Anticancer Res* 2004; 24:1727-1732.
33. Chen W, Yoshida S, Ohara N, Matsuo H, Morizane M, Maruo T. Gonadotropin-releasing hormone anagonist cetorelix down-regulates PCNA and EGF expression and up-regulates apoptosis in association with enhanced PARP expression in cultured human leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(2):884-892.
34. Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL. Thiol oxidation-induced embryonic cell death in mice is prevented by the antioxidant dithiothreitol. *Biol Reprod* 1999; 61 (4):1162-1169.
35. Liu L, Keefe DL. Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* 2000; 62(6):1828-1834.
36. Lopes S, Jurisicova A, Casper RF. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13:703-708.
37. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:93-98.
38. Levy R, Benchaib M, Cordonier H, Souchier C, Guerin JF. Annexin V labelling and terminal transferase-mediated DNA and labelling (TUNEL) assay in human arrested embryos. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:775-783.
39. Yang HW, Hwang KJ, Know HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 1998; 13:998-1002.

40. Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil* 1999; 117 (1):97-105.
41. Hardy K. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:919-925.
42. Alnemri TF, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *J Biol Chem* 1994; 269 (49):30761-30764.
43. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gereau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376:37-43.
44. Exley GE, Tang C, Mcelhinny AS, Warner CM. Expression of caspase and bcl-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. *Biol Reprod* 1999; 61:231-239.
45. Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, Biggers JD. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod* 1994; 50: 1027-1033. Erratum in: *Biol Reprod* 1994 Aug;51(2):345.
46. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
47. SAS. Statistical Analysis System, SAS 8.2 Cary, NC, USA: Statistical Analysis System Institute, Inc.; 1999-2001.
48. Casañ EM, Raga F, Bonilla-Musoles F, Polan ML. Human oviductal gonadotrophin-releasing hormone: Possible implications in fertilization, early embryonic development, and implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(4):1377-1381.
49. Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine Rev* 2004; 25:235-275.



50. Ayalon D, Farhi Y, Comaru-Schally AM, Schally AV, Eckestein N, Vagma I, Limor R. Inhibitory effect of highly potent antagonist of LH releasing hormone (SB-75) on the pituitary gonadal axis in the intact and castrated rat. *Neuroendocrinology* 1993; 58:153-159.
51. Muller A, Busker E, Engel J. Structural investigation of cetrorelix, a new potent and long-acting LH-RH antagonist. *Int J Peptide Protein Res* 1994; 43:264-270.
52. Reissmann T, Schally AV, Bouchard P. The LHRH antagonist cetrorelix: a review. *Hum Reprod* 2000; 6:322-331.
53. Hoffmann SH, Laak TT, Kuhne R, Reilander H, Beckers T. Residues within transmembrane helices 2 and 5 of human gonadotropin-releasing hormone receptor contributed to agonist and antagonist binding. *Mol Endocrinol* 2000; 14:1099-1115.
54. Segal-Abramson T, Kitroser H, Levy J, Schally AV, Sharoni Y. Direct effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists and antagonists on MCF-7 mammary cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2336-2339.
55. Emons G, Schroder B, Ortmann O, Westphalen S, Schulz KD, Schally AV. High affinity binding and direct antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone analogs in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metabol* 1993; 77:1458-1464.
56. Pinski J, Reile H, Halmos G, Groot K, Schally AV. Inhibitory effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone on the growth of the androgen-independent dunning R-3327-AT-1 rat prostate cancer. *Int J Cancer* 1994; 59:51-55.
57. Chatzistamou I, Schally AV, Szepeshazi K, Groot K, Hebert F, Arencibia JM. Inhibition of growth of ES-2 human ovarian cancers by bombesin antagonist RC-3095, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix. *Cancer Lett* 2001; 171:37-45.

58. EMONS G., MULLER V., ORTMANN O., SCHULZ K.D. Effects of LHRH-analogues on mitogenic signal transduction in cancer cells. *J Steroid biochem Mol Biol* 1998; 65:199-206.
59. Srkalovic G, Bokser L, Radulovic S, Korkut E, Schally AV. Receptors for luteinizing-releasing hormone (LHRH) in dunning R3327 prostate cancer and rat anterior pituitaries after treatment with a sustained delivery system of LHRH antagonist SB-75. *Endocrinology* 1990; 127:3052-3060.
60. Kovacs M, Schally AV. Comparison of mechanisms of action of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist cetrorelix and LHRH agonist triptorelin on gene expression of pituitary LHRH receptors in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:12197-12202.
61. Halmos G, Schally AV, Kahan Z. Down-regulation and change in subcellular distribution of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in OV-1063 human epithelial ovarian cancers during therapy with LH-RH antagonist cetrorelix. *Int J Oncol* 2000; 17:367-373.
62. Tang X, Yano T, Osuga Y, Matsumi H, Yano N, Xu J, Wada O, Koga K, Kugu K, Tsutsumi O, Schally AV, Taketani Y. Cellular mechanisms of growth inhibition of human epithelial ovarian cancer cell line by LH-releasing hormone antagonist cetrorelix. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3721-3727.
63. HersHKovitz E, Marbach M, Bosin E, Levy J, Roberts CT, LeRoith D, Schally AV, Sharoni Y. Luteinizing hormone-releasing hormone antagonists interfere with autocrine and paracrine growth stimulation of MCF-7 mammary cancer cells by insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metabol* 1993; 77:963-968.
64. Moretti RM, Montagnani MD, Dondi D, Poletti A, Martini L, Motta M, Limonta P. Luteinizing hormone-releasing hormone agonists interfere with the stimulatory actions of

- epidermal growth factor in human prostatic cancer cell lines, LNCaP and DU 145. *J Clin Endocrinol Metabol* 1996; 81:3930-3937.
65. Lamharzi N, Halmos G, Jungwirth A, Schally AV. Decrease in the level and mRNA expression of LH-RH and EGF receptors after treatment with LH-RH antagonist cetorelix in DU-145 prostate tumor xenografts in nude mice. *Int J Oncol* 1998; 13:429-435.
66. Szepeshazi K, Halmos G, Schally AV, Arencibia JM, Groot K, Vadillo-Buenfil M, Rodriguez-Martin E. Growth inhibition of experimental pancreatic cancers and sustained reduction in epidermal growth factor receptor during therapy with hormonal peptide analogs. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125:444-452.
67. Hunter T. Protein kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling: Review. *Cell* 1995; 80:225-236.
68. Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activity protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Rev* 2001; 22:153-183.
69. Paria BC, Tsukamura H, Dey SK. Epidermal growth factor-specific protein tyrosine phosphorylation in preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 1991; 45:711-718.
70. Palma GA, Muller M, Brem G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) ant high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. *J Reprod Fertil* 1997; 110:347-353.
71. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN. Presence of epidermal growth factor during maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after fertilization. *Mol Reprod Dev* 1998; 51:395-401.

72. Stachecki JJ, Armant DR. Regulation of blastocoele formation by intracellular calcium release is mediated through a phospholipase C-dependent pathway in mice. *Biol Reprod* 1996; 55(6):1292-1298.
73. Pauken CM, Capco DG. The expression and stage-specific localization of protein kinase C isotypes during mouse preimplantation development. *Dev Biol* 2000; 223:411-421.
74. Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Gonçalves PBD, Tilly JL, Ruenda BR. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology* 2002; 143(4):1495-1501.
- (9) Figure legends, (10) Tables, (11) Figures

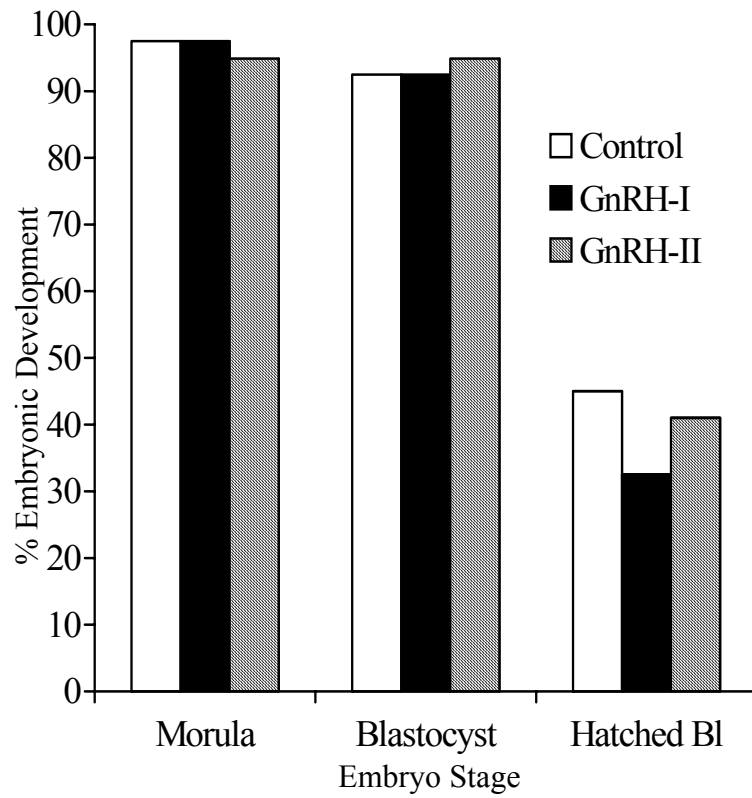


Figure 1: Effect of GnRH-I and GnRH-II on early mouse embryonic development. The 1-cell embryos were cultured with or without 10  $\mu$ M of GnRH-I or GnRH-II (n = 40/trt).

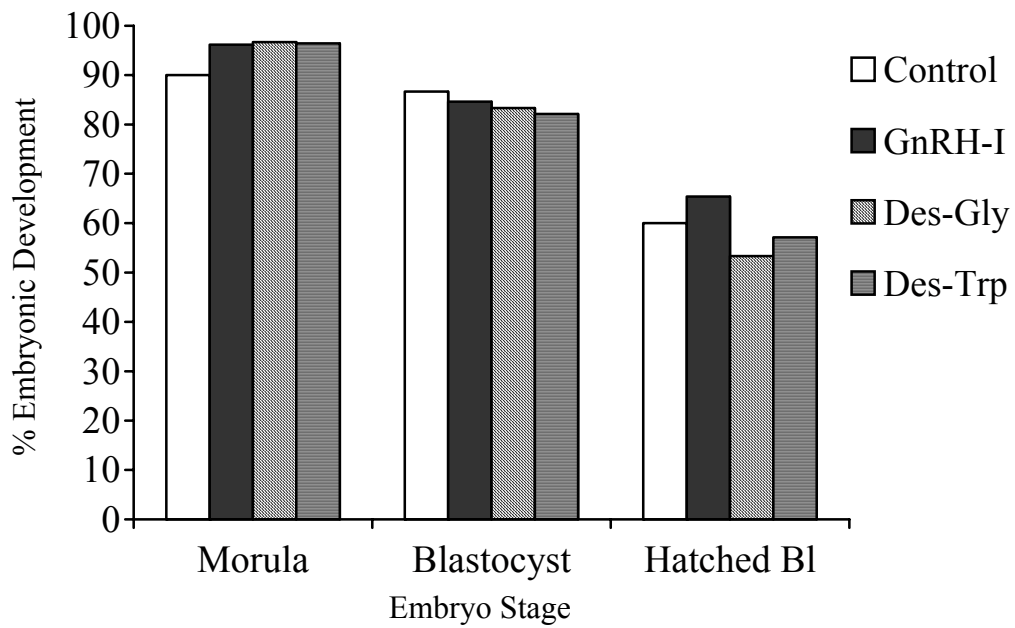


Figure 2: The effect of GnRH-I and its agonists on GnRH in early mouse embryonic development. One-cell embryos were cultured with or without 10  $\mu$ M of GnRH-I or its analogs (n = 26-30/trt).

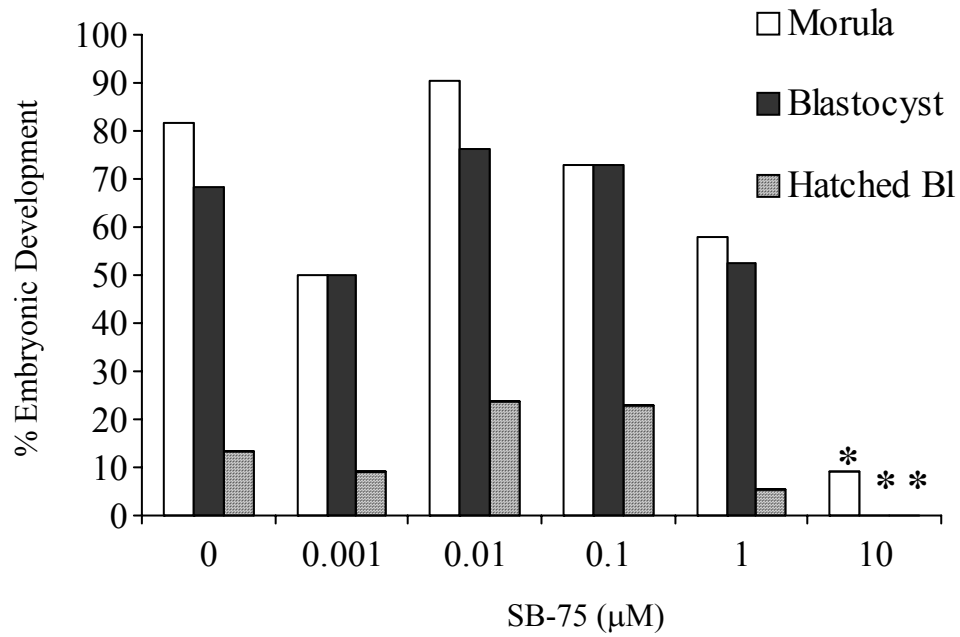


Figure 3: Effect of different concentrations of SB-75 on embryonic development. One-cell embryos were cultured with different concentrations of SB-75 (n = 22). \*  $P < .001$  vs. controls.

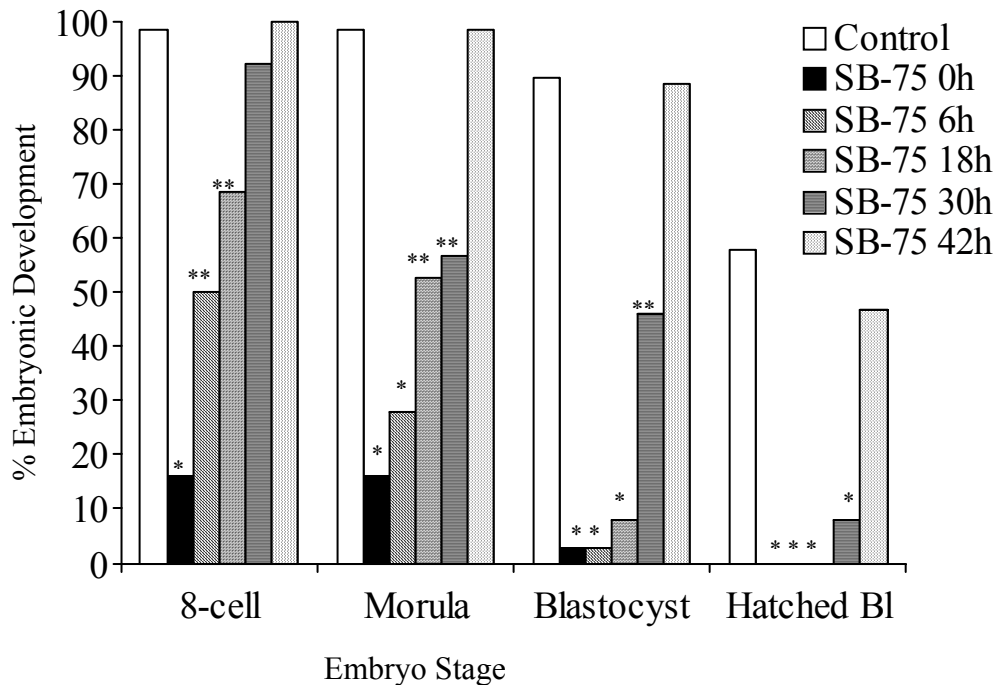


Figure 4: Effect of SB-75 treatment at different time points during embryonic development.

One-cell embryos were cultured with or without 10  $\mu$ M SB-75 ( $n = 37$ ), beginning at different timepoints during embryo culture. \*  $P < .001$  vs. controls.



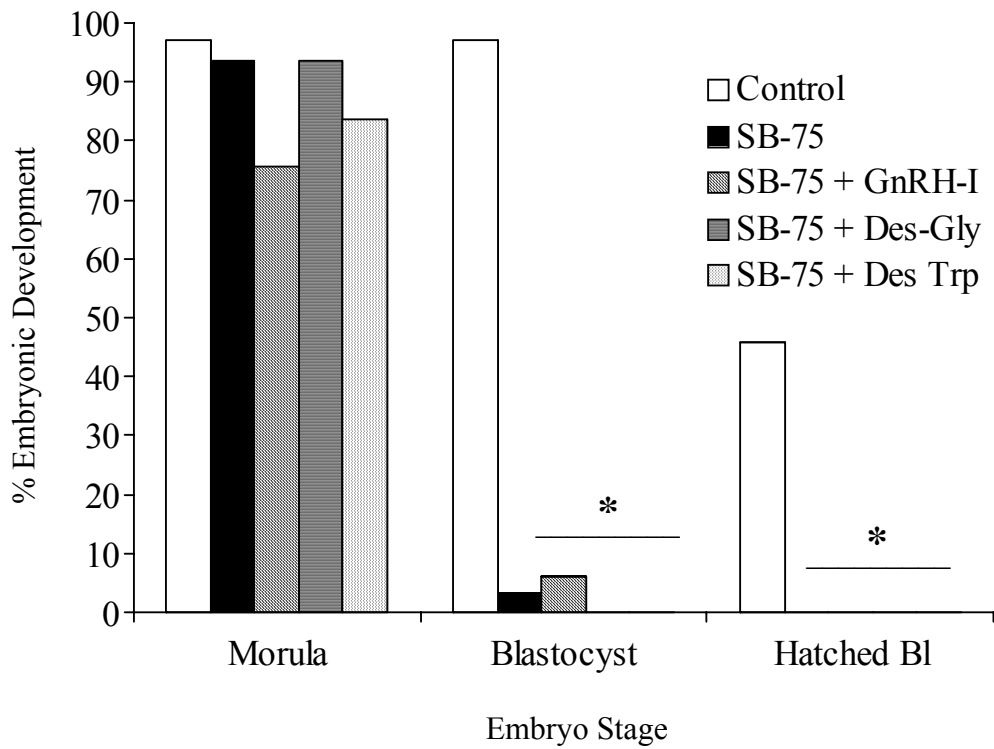


Figure 5: Effect of GnRH-I and its antagonists in rescue embryonic development in embryos treated with SB-75. One-cell embryos were cultured with 10  $\mu$ M of SB-75 alone or with different combinations of GnRH analogs (n = 32-37/trt). \*  $P < .001$  vs. controls.

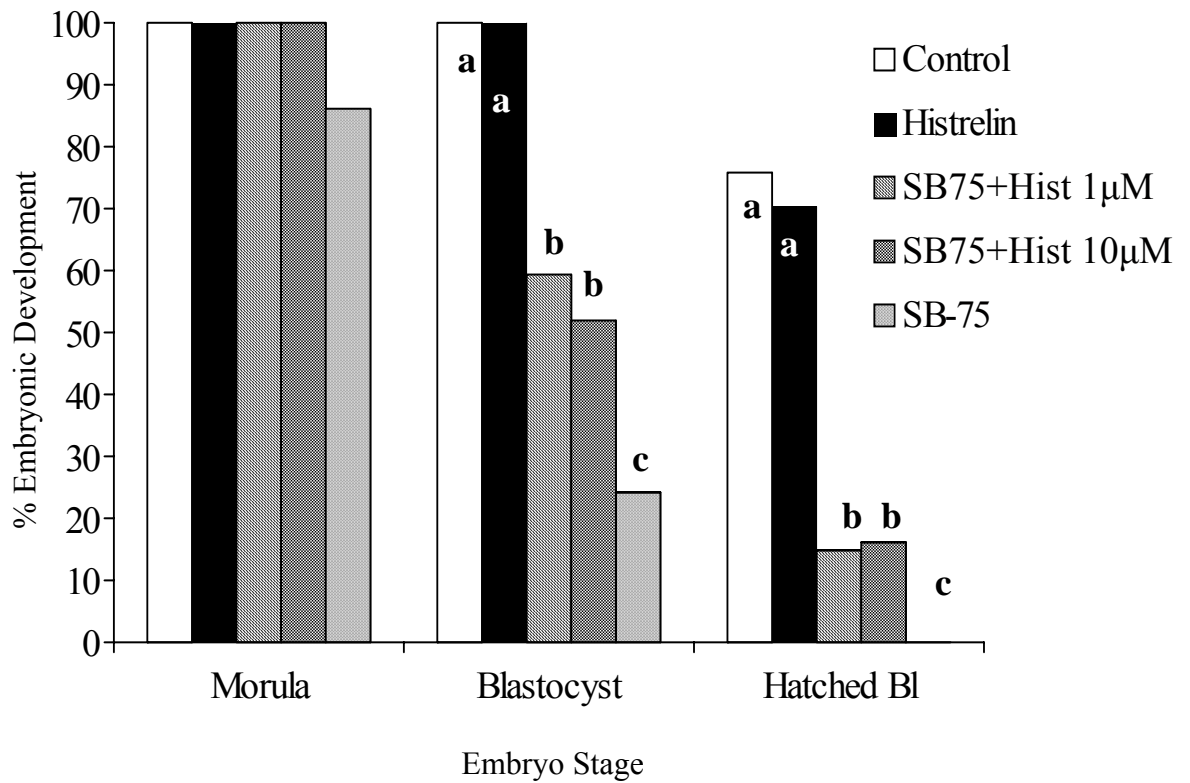


Figure 6: The ability of histrelin to rescue SB-75 inhibition of embryonic development (n = 25-30/trt). Bars with different letters within each embryo stage differ ( $P < .05$ ).

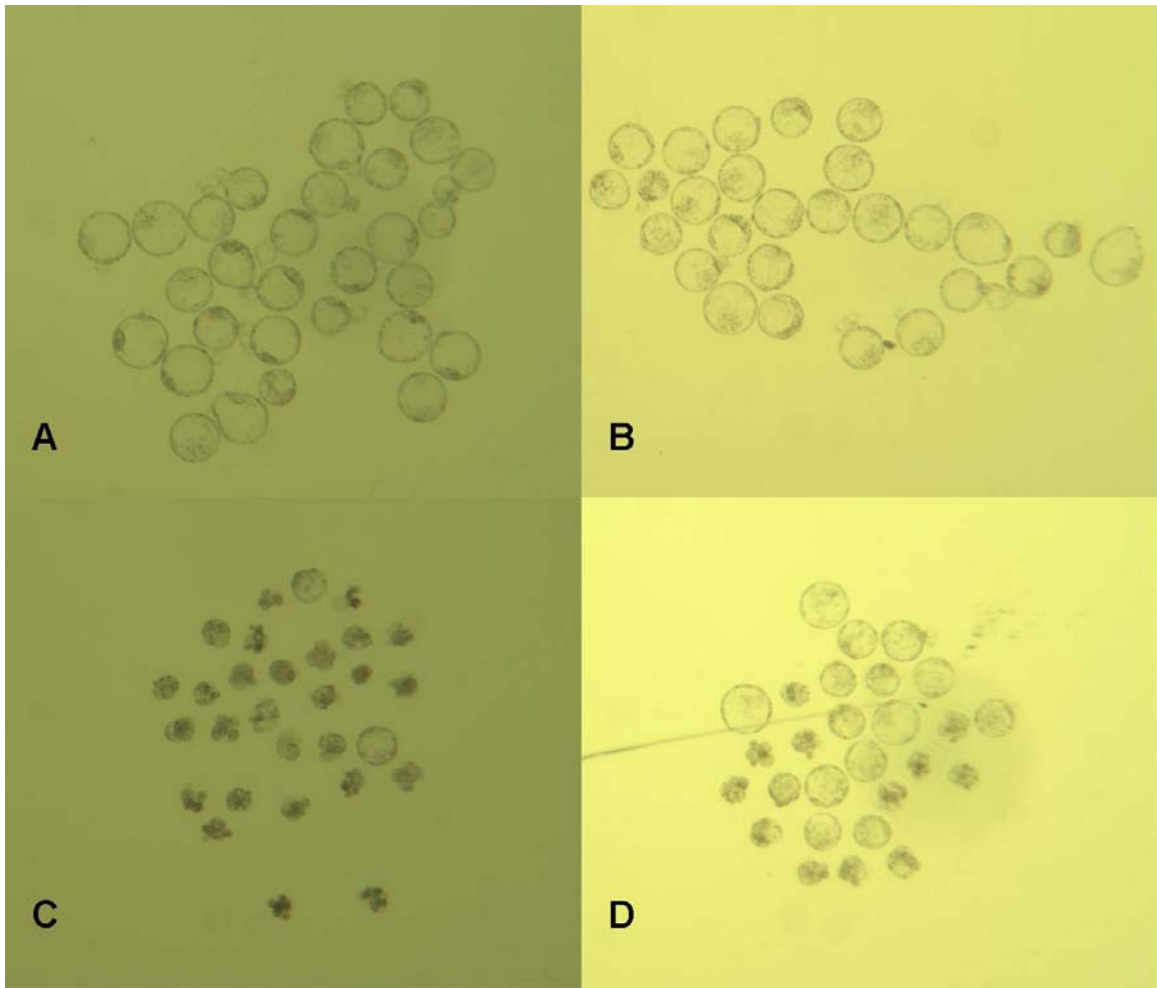


Figure 7: Photomicrograph of mouse embryos following 120 hours of culture in the following treatments: **A)** Control, **B)** 10  $\mu\text{M}$  histrelin, **C)** 10  $\mu\text{M}$  SB-75 and **D)** 10  $\mu\text{M}$  SB-75 + 1  $\mu\text{M}$  histrelin.

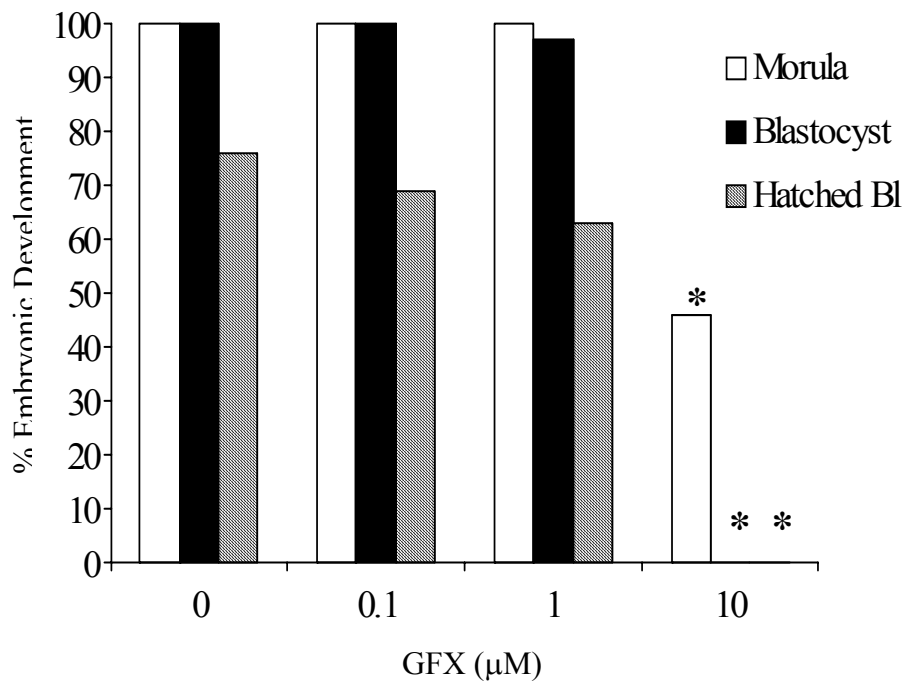


Figure 8: Effect of the PKC inhibitor, GF109203X (GFX) on early mouse embryonic development. One-cell embryos were cultured with different concentrations of GFX (n = 35/trt). \*  $P < .001$  vs. controls.

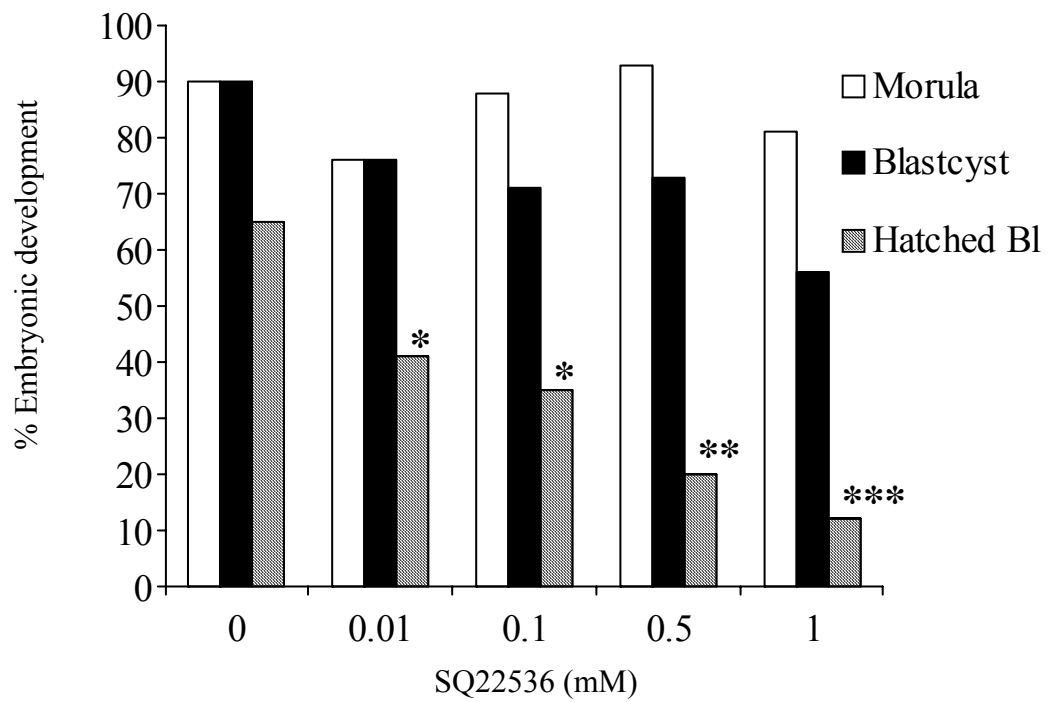


Figure 9: Effect of the PKA inhibitor, SQ22536, on early mouse embryonic development.

One-cell embryos were cultured with different concentrations of SQ22536 (n = 17/trt). \*  $P < .05$  vs. controls.

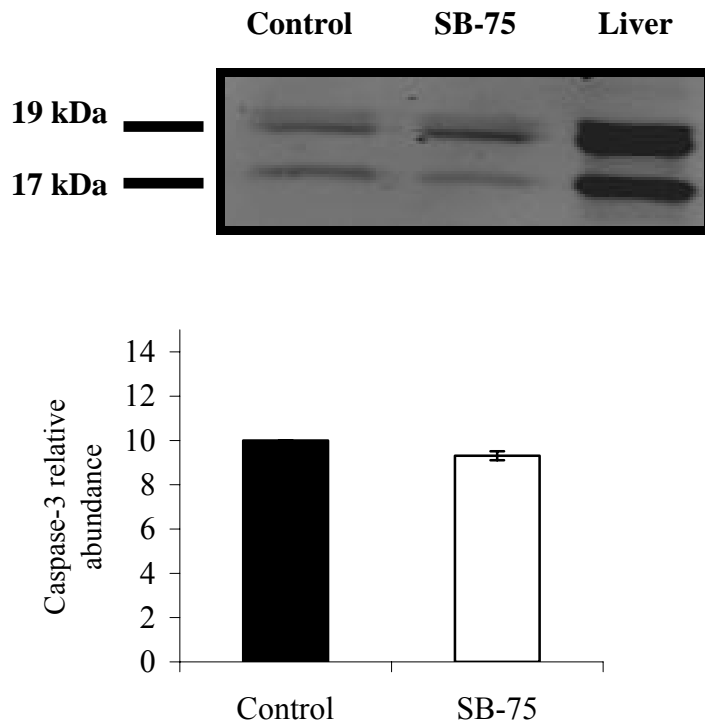


Figure 10: Effect of SB-75 on levels of activated caspase-3 in mouse embryos. Activated caspase-3 protein was immunodetected by Western blot analysis. Lane 1 and 2 were loaded with 30  $\mu$ l of soluble extracts corresponding to approximately 200 hundred embryos at the 2 to 4-cell stage harvested after 36 hours of culture in the presence or absence of 10  $\mu$ M SB-75. The relative abundance in the blots from the two cleaved subunits of activated caspase-3 (19 and 17 kDa) was normalized by the number of embryos present in each sample. An arbitrary unit was assigned to the intensity levels found in the control blots in order to compare with levels in the treatment group. The graph is a representation of the means of two individual experiments.

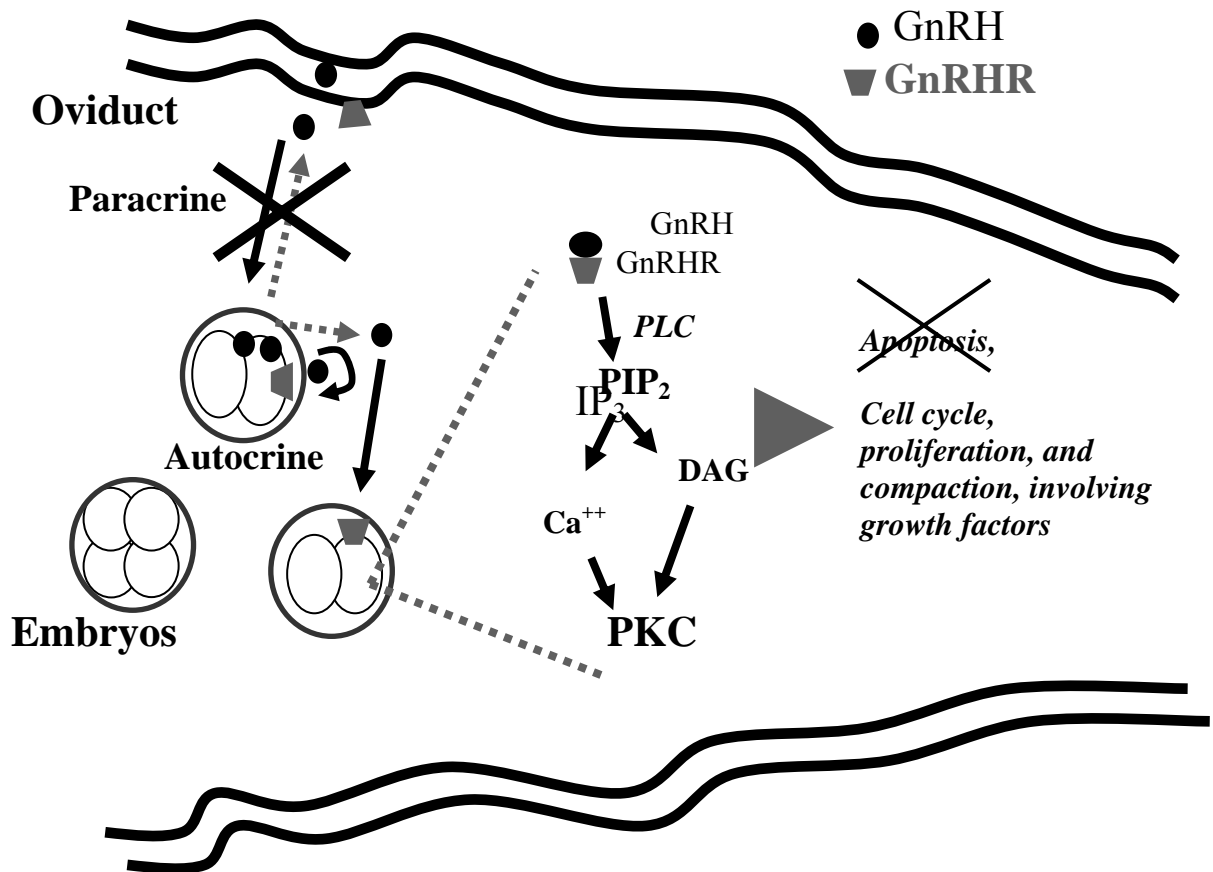


Figure 11: Proposed mechanism of action of GnRH in the oviduct during early embryogenesis.

## **4. CAPÍTULO 2**

**TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:**

**COMPARISON OF DEVELOPMENT *IN VITRO* BETWEEN  
MEISHAN AND WHITE CROSSBRED SWINE EMBRYOS  
FOLLOWING VITRIFICATION BY MICRODROPLET  
METHOD**

**Marcelo M Montagner, Paulo BD Gonçalves, Ginger Mills, Ronald  
Christenson and Brett R White.**

**BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2005**



**(1) Title**

Comparison of Development *In Vitro* between Meishan and White Crossbred Swine Embryos Following Vitrification by Microdroplet Method

Key word: Cryopreservation, Pig, Embryo, Vitrification, Ethylene glycol, Microdroplet (5 key words)

Marcelo M Montagner<sup>1,2</sup>, Paulo BD Gonçalves<sup>2</sup>, Ginger Mills<sup>1</sup>, Ronald Christenson<sup>3</sup> and Brett R White<sup>2, a</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory of Reproductive Physiology, Department of Animal Science, University of Nebraska, Lincoln, NE – 68583-0908.

<sup>2</sup> Biotechnology and Animal Reproduction Laboratory - Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil – 97115-970.

<sup>3</sup>USDA, ARS, RLH U.S. Meat Animal Research Center, Clay Center, NE, USA

**(2) Abstract**

Cryopreservation of zona pellucida-intact porcine embryos could greatly impact the swine industry and serve as a tool for conservation of germplasm. Pig embryos are very sensitive to cooling and few reports have shown successful developmental rates following embryo cryopreservation in this species. The objectives of this study were to investigate *in vitro* development of embryos from Chinese Meishan (M) and occidental white crossbred (WC) females following cryopreservation. The percentage of embryos surviving 24 h after cryopreservation was higher for M (72%) than WC (44%;  $P < 0.001$ ) embryos. However, *in vitro* development of embryos that survived cryopreservation was not different between M

---

<sup>a</sup> Corresponding author: Tel.: 011-1-402-472-6438; *E-mail*: bwhit1@unlnotes.unl.edu  
University of Nebraska, A224j Animal Science, Lincoln – NE – USA, 68583-0908

and WC at the expanded (64%) or hatched (22%) blastocyst stages. Developmental rates were significantly higher for control embryos than vitrified embryos from both M and WC at expanded blastocyst stage ( $P < 0.001$ ), but not at hatched blastocyst stage. Rates of expanded blastocyst formation did not differ between M and WC embryos (98 and 95%, respectively). With a new procedure to warm vitrified pig embryos, the survival rates may be improved in WC embryos, but not in M embryos. The optimal stages to vitrify pig embryos using the microdroplet method ranges from late compact morula to early expanded blastocyst. Our results suggest that M embryos have a higher capacity to survive the vitrification process than WC embryos independently of the embryo stage.

### **(3) Introduction**

The swine population in the world is estimated to be around 940 million and great part of human population has pig meat as an important source of protein. Cryopreservation of zona pellucida-intact porcine embryos could greatly impact the swine industry by serving as a tool for conservation of germplasm and providing biosecurity for transfer of genetic material.

Pig embryos are very sensitive to cooling and ice crystallization during cryopreservation [1 – 4]. Therefore, the efficiency of cryopreservation is much lower in pig embryos than in embryos from other species. To avoid ice crystal formation, the vitrification method appears to be the most promising technique for cryopreservation of swine embryos [5]. During vitrification, an amorphous glass is formed preventing embryos from being subjected to cellular damage associated with ice crystal formation [6].

Porcine embryos have been successfully cryopreserved at the hatching and hatched blastocyst stages [7, 8]. At these stages however, the zona pellucida is unable to function as a barrier against infectious organisms. In addition, cryopreservation has been performed successfully on embryos from the 4-cell [9] to early blastocyst stages [10]. However, the

procedure used in these studies requires creation of a hole in the zona pellucida to remove the lipid content after centrifugation. This manipulation also disrupts the role of an intact zona pellucida to prevent disease transmission.

The open pulled straw (OPS) method plus cytoskeletal stabilization of zona-intact embryos before vitrification produced piglets after cryopreservation [11, 12]. Dobrinsky et al. [13] showed that the OPS method improved the survival rate of vitrified peri-hatching pig embryos. It is possible to freeze compacted morulae stage porcine embryos and produce live offspring by using the OPS method without cytoskeletal stabilization pretreatment [14]. Using a modified microdroplet method, described previously to vitrify bovine oocytes [15], Misumi et al. [16], successfully produced piglets from vitrified morulae and early blastocysts. In this study, the pregnancy rate of embryo recipients was 40% and the percentage of live piglets born per embryo transferred was 10%. The advantage of this method is that it does not require chemical pretreatment or manipulation of the zona-intact embryos.

There is a great interest to study the difference between Meishan and occidental swine. Meishan are more prolific than white swine breeds, they have higher ovulation rate, greater uterine capacity and greater embryonic survival [17 – 20]. Berthelot et al. [11] showed that M embryos could support better the vitrification process than Large White. The characteristics of interest present in Meishan pigs can be introduced in the herd by traditional crossing. Using crossing, other characteristics not desirable, as fat carcass, are carried on. However, with the advance of the genetic engineering there is a potential to create transgenic animals expressing just the genes of interest. Therefore, it is important the conservation of germplasm for the future generations. In this way, the comparison of embryonic development after cryopreservation between embryos from different genotypes can help in the discovery of important factors for embryonic survival after vitrification. Thus the objectives of this study were: 1) to determine the efficiency of freezing pig embryos using a microdroplet vitrification

method, 2) to examine *in vitro* development of Meishan (M) and white crossbred (WC) embryos following cryopreservation, 3) investigate the effect of two warming methods on M and WC embryonic development of vitrified embryos, and 4) determine the importance of embryonic stage for M and WC on survival rates after cryopreservation by microdroplet vitrification method.

#### **(4) Material and Methods**

##### *Experiment 1: Efficiency of microdroplet method*

We performed the microdroplet vitrification procedure with some modifications from the original published protocol [16]. Basically, the modifications were: BECM medium instead of M2, microdroplet with 5  $\mu$ l instead of 1  $\mu$ l and some difference in the concentrations of sucrose. Our intention was to verify that we could produce liveborn piglets using modified microdroplet protocol. Embryos from WC females on Day 5 following estrus (Day 0 = onset of estrus) were surgically collected using Beltsville Embryo Culture Medium (BECM) [21]. After flushing, the embryos were selected, cryopreserved-warmed following the microdroplet protocol described in Fig. 1. Immediately prior to embryo transfer, the embryos were warmed. On Day 5 of the estrous cycle, we transferred 24 compact morulae (CM) to one WC recipient and 24 CM/blastocysts to another. The recipients were allowed to gestate to term.

##### *Experiment 2: Comparison of in vitro development of M and WC embryos following cryopreservation*

First parity M sows (n = 11) and WC gilts (n = 13) were observed for estrus every 12 h and inseminated at 12 and 24 h after onset of estrus within breed using semen from 2 different

boars. Females were sacrificed between Day 4.5 and 6 after estrus and embryos were collected. Compact morula and blastocyst stage embryos from each female within breed were randomly allocated either directly into the culture system to serve as controls (68 M and 48 WC embryos) or to undergo vitrification (101 M and 78 WC embryos). Embryos from each treatment were cultured in 50  $\mu$ l drops of modified Whitten's medium + 1.5% BSA [22] under oil at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> in air environment and scored daily for development. Embryos were considered to have survived if they advanced a stage in development following 24 h of culture and did not show signs of lyses or degeneration. The percentages of expanded and hatched blastocysts were calculated over the number of survived embryos only.

*Experiment 3: Effect of two warming protocols on embryonic development*

Embryos from 9 WC and 7 M females were randomly allocated to 2 warming protocols, either the control protocol used in the Experiment 1 and 2 (n = 61) or the new hot warm protocol (n = 62). The new hot warm protocol was very similar to the control protocol with the following exceptions, the microdrop was warmed directly on a glass slide at 37°C. After that, a glass pipette was used to add approximately 60  $\mu$ l of WS1 medium around the broken tip. Then, embryos were removed and released into a Petri dish containing WS1. Next, the last 4 steps described in the control protocol were followed.

*Experiment 4: Importance of embryonic stage on survival rates after vitrification*

A total of 93 blastocysts/early expanded blastocysts from 4 M (n = 42) and 7 WC (n = 51) females were compared with 56 compacted 8-cells/early morulae from 4 M (n = 26) and 4 WC (n = 30) females to determine survival rates following cryopreservation. Following the hot warm procedure described in Experiment 3, embryos were cultured for 24 h and survival rates were determined.

### *Statistical analysis*

Data were analyzed with a non-parametric  $X^2$  test using the CATMOD procedure of Statistical Analysis System [30]. The percentages at different stages were compared between groups and statistically significant difference was considered if  $P < 0.05$ .

## **(5) Results**

### *Experiment 1: Efficiency of the microdroplet protocol*

We performed two embryo transfers by transferring 24 embryos into each WC recipient on Day 5. On Day 21, the female that received 24 compact morulae returned to estrus. The recipient that received a combination of compact morulae/blastocysts ( $n = 24$ ) produced six live offspring. These piglets were healthy and exhibited a normal phenotype.

### *Experiment 2: In vitro development of embryos following cryopreservation*

The retrieval rates from the cryovials for both breeds were above 92% (Fig. 2). The survival rate was higher for M (72%) than WC (44%,  $P < 0.001$ , Fig. 2). However, rates of *in vitro* development of embryos that survived cryopreservation were not different between M and WC to the expanded (64%) or hatched (22%) blastocyst stages (Fig. 3). Developmental rates were significantly higher for control embryos than frozen embryos from both breeds to the expanded blastocyst stage ( $P < 0.001$ ), but no difference was observed at the hatched blastocyst stage (Fig. 3). Rates of expanded blastocyst formation did not differ between M and WC control embryos (98 and 95%, respectively), but more M embryos developed to the hatched blastocyst stage (22% for M v. 9% for WC;  $P < 0.05$ ).

*Experiment 3: Effect of two warming protocols on embryonic development*

The retrieval rate from cryovials was greater than 95% for both procedures. It was observed better survival rates and expanded blastocyst formation (Fig 4), approximately 20% more for both variables, for WC embryos ( $P < 0.05$ ). However, the hot warm protocol did not improve the results for Meishan embryos (Fig 4).

*Experiment 4: Importance of embryonic stage for each breed on survival rates after cryopreservation*

The survival rate was much higher for embryos vitrified at the blastocyst/early expanded blastocyst stage (74% for M and 47% for WC) than at the compacted 8-cell/early morula stages (31% for M and 4% for WC,  $P < 0.001$ ) in both breeds (Fig. 5). Once more, we observed a lower tolerance to vitrification for WC embryos in comparison with M embryos independently of the embryonic stage ( $P < 0.001$ ).

## **(6) Discussion**

Numerous attempts to cryopreserve pig embryos in the past 30 years have resulted in low success rates, mainly due to the sensitivity of porcine embryos to hypothermia [1 – 3]. In the 1990's and the beginning of this decade, very well designed experiments were conducted resulting in protocols that permitted the birth of live and normal piglets from cryopreserved embryos [7, 8, 10, 11, 12]. However, to perform these protocols with satisfactory results embryos must be exposed to cytoskeletal stabilization agents and/or micromanipulation procedures.

Our observation that it is possible to produce piglets after vitrification of zona pellucida-intact embryos without cytoskeletal stabilization confirms and expands a previous report using a microdroplet protocol [16]. The success of the OPS [14, 23] and microdroplet

methods can be attributed to embryos that had passed the dangerous temperature zone more rapidly than in the conventional method by increasing the cooling and warming rates.

In several cases of porcine embryo vitrification, the type and concentration of permeable cryoprotectants, sugars and macromolecules have varied greatly. Cryoprotectants, such as DMSO and ethylene glycol, can be highly toxic to embryos [24 – 26]. Differences in cytoskeleton makeup may contribute to substantial species variation in sensitivity to cryoprotectants [5]. The deleterious effects can include disruption of microfilaments during equilibration and after thawing can be evident cell lysis, disaggregation, as well as nuclear and membrane damage [21]. A concern with the microdroplet protocol was the amount of time that embryos would be exposed to EG. Bovine embryos are susceptible to EG when they are exposed to long time at warm temperatures. The microdroplet protocol includes exposure time of 10 minutes in 10% of EG, as well as 45 seconds in the vitrification media with 40% EG, all at 37°C. During the warming procedure embryos are exposed more than 10 minutes in 5 to 2.5% of EG. This can be considered a long and warmed exposition if we compare with protocols used to freeze bovine embryos. The birth of live piglets described in this study and by Misumi et al. [16] suggests that pig embryos have higher tolerance to EG than bovine embryos. We speculate this phenomenon is due to a higher lipid content in the pig embryo than in bovine embryo at the morula and blastocyst stages. Thus, cryoprotectants need to spend more equilibrium time to achieve the optimal concentration in the cytosol in order to optimize protection of the cell. If this is the case, the more fluidic characteristic of EG, when compared to another cryoprotectant as glycerol, can be the secret of the OPS and microdroplet protocols in producing piglets from vitrified compact morulae and blastocyst embryos [14, 16]. Another hypothesis is that the increased lipid levels in the cytosol of pig embryo allow them to tolerate long exposure times to high concentrations of EG. More investigation is needed to determine the optimal concentration of cryoprotectants and sugars and appropriate



equilibrium times before submitting embryos to the vitrification solution. Using EG as cryoprotectant for pig embryos, probably, less than 10 minutes is enough to produce equilibrium before vitrification. The permanence of embryo in the vitrification solution prior vitrification was recommended to be 30 seconds [16] to 1 minute [14]. In practice, when the vitrification is performed, it is difficult to keep the exact time of exposure to the vitrification solution, based on this work and the literature, we can conclude that 30 seconds to 1 minute seems to be reasonable.

The base solution can play an important role in embryo survival rates after vitrification [11]. The base solution in the present study was BECM, but others have been used: PBS [11, 25, 26], TCM-199 [14, 27], pNCSU23 [28], and M2 [16]. BECM was designed specifically for swine embryos [21] and is probably more suitable for vitrification of pig embryos.

We used a lower concentration of sucrose in the equilibrium and vitrification media and a larger microdroplet than Misumi et al. [16], although the effect of these modifications on development was not investigated. However, we observed an advantage of a 5  $\mu$ l instead of 1  $\mu$ l drop, because more embryos can be handled and the risk of losing embryos inside the glass pipette is diminished.

Only one study has compared cryopreservation of embryos from M and occidental white breeds [11]. Berthelot et al. [11], comparing Large White hyperprolific (LWh) and Meishan (M) embryos, found that LWh blastocysts (27%) had a lower viability *in vitro* than M blastocysts (67%), when embryos were vitrified with PBS. However, no difference between breeds (41 and 43%) was detected using TCM as the base vitrification solution. In the same study, developmental rates of morulae vitrified were not different between breeds (11% for LWh and 14% for M, respectively), although viability rates were low. In contrast, we observed that M embryos presented a better capacity to survive the vitrification process than WC embryos at all developmental stages examined; compacted 8-cell, early morula,

compact morula, blastocyst or expanded blastocyst. In our study, this difference between breeds for embryonic survival was almost 30%, regardless developmental stage at cryopreservation. However, from embryos that survived vitrification, no difference was observed between breeds for *in vitro* embryonic development to the expanded or hatched blastocyst stages. This finding is intriguing, because in general WC embryos must have some common characteristics, which implies in less capacity to survive cryopreservation. On the other hand, WC embryos with ability to survive vitrification should have similar cellular profile in comparison with survived M embryos.

The warming procedure is a key step to successful survival after cryopreservation. Rehydration and warm up rates are highly important aspects for this procedure. In the hot warm procedure proposed in this study, the embryos are quickly warmed in the microdroplet itself and the vitrification solution is diluted gradually for a few seconds with the first warming solution. Using the hot warm protocol the embryonic survival and development to the expanded blastocyst stage were improved for WC embryos, but no difference was detected for Meishan. In addition, the hot warm procedure is convenient because it is easier to locate the embryos after warming.

The development of an efficient protocol to cryopreserve 8-cell and early morula embryos is important for the practical use of porcine embryo transfer in the field. Cryopreservation at these stages is possible [9, 10], but these protocols involve micromanipulation, centrifugation and cytoskeletal stabilization. In the present study, the microdroplet method produced unsatisfactory results for survival rate of cryopreserved 8-cell compacted/early morula. The stage of the embryo had a strong effect on embryonic survival for both breeds. Approximately 40% more embryos survived when vitrified at the blastocyst/expanded blastocyst stages than at the compacted 8-cell/early morula stages. Consistent with this, porcine morulae are more sensitive to vitrification than blastocysts using

the OPS method [11, 23]. It is important to point out that 8-cell pig embryos can show signs of compaction. These embryos can be easily confused with morulae or compact morulae. Therefore, researchers and technicians in the field must diligently evaluate embryos prior to vitrification. An incorrect evaluation could result in decreased survival rates of cryopreserved embryos.

Peri-hatching porcine embryos seem to tolerate cryopreservation best, likely because the lipid composition changes during this stage, which can increase the tolerance of embryos to vitrification [29]. The high lipid content found in pig embryos prior to the pre-hatching blastocyst stage has been considered the main factor in the failure of conventional cryopreservation protocols [29]. In a novel study Nagashima and coworkers [9], indicated the crucial negative role exerted by lipidic content in blastomeres on cryopreservation of 4 and 8-cell pig embryos. The mechanisms underlying metabolism of lipid in the pig embryo is poorly understood. Further, the data regarding molecular interactions and alterations that occur during cryopreservation of pig embryos is limited. In this field, a study by Dobrinsky et al. [13] greatly contributed to our knowledge of the complex interactions between microfilaments, microtubules, lipids, cellular and nuclear membranes, gap junctions and cellular organelles that can be disrupted when pig embryos are submitted to vitrification.

In summary, our study describes a vitrification method for zona pellucida-intact swine embryos that is effective in producing normal live piglets. The hot warm procedure improved survival rates for WC embryos but did not improve viability of M embryos. This procedure is more easily conducted without a detrimental effect on embryos. The optimal stage to vitrify pig embryos using the microdroplet protocol is between the late compact morula and early expanded blastocyst stages. Finally, our results suggest that M embryos have a higher capacity to survive the vitrification process than WC embryos. Although, embryos from both breeds that survive vitrification have a similar capability for development *in vitro*.

### **(7) acknowledgments**

Funding for Marcelo M Montagner provided by CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Ministério da Educação, Brazil.

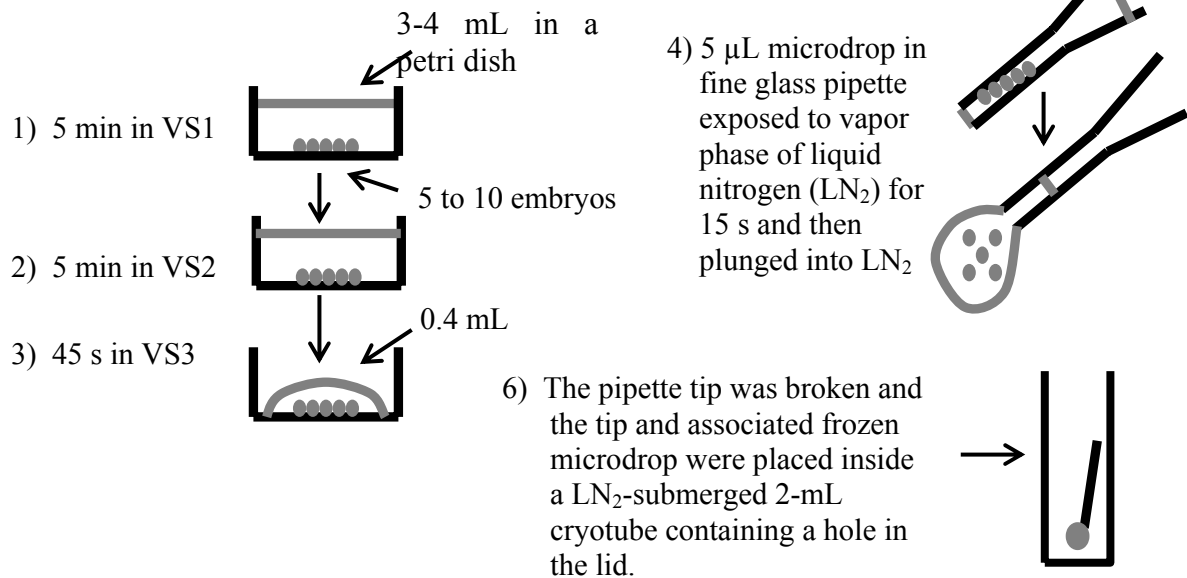
### **(8) References**

1. Wilmut I. The low temperature preservation of mammalian embryos. *J Reprod Fertil* 1972; 31:513-514.
2. Polge C, Willadsen SM. Freezing eggs and embryos of farm animals. *Cryobiology* 1978; 15:370-373.
3. Yoshino J, Kojima T, Shimizu M, Tomizuka T. Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. *Cryobiology* 1993; 30:413-422.
4. Pollard JW, Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 1994; 41:101-106.
5. Dobrinsky, JR. Cryopreservation of porcine embryos. *J Reprod Fertil* 1997; 52:301-312.
6. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryo at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313:573-575.
7. Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Nottle MB. Improved survival of porcine hatched blastocysts cryopreserved with glycerol. *J Reprod Dev* 1995; 41:165-170.
8. Kobayashi S, Takei M, Kano M, Tomita M, Leibo SP. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. *Cryobiology* 1998; 36:20-31.
9. Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Nottle MB. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature* 1995; 374:416.

10. Dobrinsky JR, Nagashima H, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Cryopreservation of swine embryos with reduced lipid content. *Theriogenology* 1999; 51:164[abstract].
11. Berthelot F, Martinat-Botte F, Locatelli A, Perreau C, Terqui M. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 2000; 41:116-124.
12. Beebe LFS, Cameron RD, Blackshaw AW, Higgins A, Nottle MB. Piglets born from centrifuged and vitrified early and peri-hatching blastocysts. *Theriogenology* 2002; 57:2155-2165.
13. Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod* 2000; 62:564-570.
14. Berthelot F, Martinat-Botte F, Perreau C, Terqui M. Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compact morula stage embryos with intact zona pellucida. *Reprod Nutr Dev* 2001; 41:267-272.
15. Papis K, Shimizu M, Izaike Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 2000; 54:651-658.
16. Misumi K, Suzuki M, Sato S, Saito N. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 2003; 60:253-260.
17. Wilmut I, Ritchie WA, Haley CS, Ashworth CJ, Aitken RP. A comparison of rate and uniformity of embryo development in Meishan and European white pigs. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 45-56.
18. Christenson RK. Ovulation rate and embryonic survival in Chinese Meishan and white crossbred pigs. *J Anim Sci* 1993; 71:3060-3066.

19. Galvin JM, Wilmut I, Day BN, Ritchie M, Thomson M, Haley CS. Reproductive performance in relation to uterine and embryonic traits during early gestation in Meishan, Large White and crossbred sows. *J Reprod Fert* 1993; 98:377-384.
20. Youngs CR, Christenson LK, Ford SP. Investigations into the control of litter size in swine: III. A reciprocal embryo transfer study of early conceptus development. *J Anim Sci* 1994; 72:725-731.
21. Dobrinsky JR, Johnson LA, Rath D. Development of culture medium (BECM-3) for porcine embryos: Effect of bovine serum albumine and fetal bovine serum on embryo development. *Biol Reprod* 1996; 55:1069-1074.
22. Beckmann LS, Day BN. Effects of media NaCl concentration and osmolarity on the culture of early stage porcine embryos and the viability of embryos cultured in a selected superior medium. *Theriogenology* 1992; 39:611-622.
23. Cuello C, Gil MA, Tornel J, Vazquez JM, Roca J, Berthelot F, Martinat-Botte F, Martinez EA. In vitro development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Theriogenology* 2004; 62:275-286.
24. Weber PK, McGinnis LK, Youngs CR. An evaluation of potential vitrification solutions for cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology* 1992; 37:321[abstract]
25. Dobrinsky JR, Johnson LA. Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: a study of in vitro development. *Theriogenology* 1994; 42:25-35.
26. Weber PK, Youngs CR. Investigation of cryoprotectant toxicity to porcine embryos. *Theriogenology* 1994; 41:1291-1298.
27. Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Tornel J, Vazquez JM, Roca J, Berthelot F, Martinat-Botte F, Martinez EA. Vitrification of porcine embryos at various development stages using different ultra-rapid cooling procedures. *Theriogenology* 2004; 62:353-361.

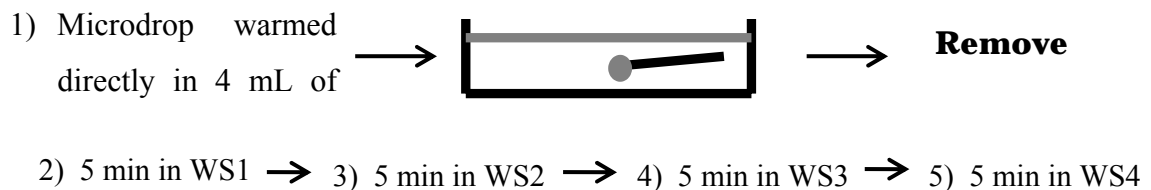
28. Cameron RDA, Beebe LFS, Blackshaw AW, Keates HL. Farrowing rates and litter size following transfer of vitrified porcine embryos into a commercial swine herd. *Theriogenology* 2004; 61:1533-1543.
29. Dobrinsky JR. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 1996; 45:17-26.
30. SAS. Statistical Analysis System, SAS 8.2 Cary, NC, USA: Statistical Analysis System Institute, Inc.; 1999-2001.

**Protocol for vitrification:**

VS1: BECM + 10% ethylene glycol (EG)

VS2: BECM + 10% EG + 0.27 M sucrose + 1% polyethylene glycol (PEG)

VS3: BECM + 40% EG + 0.36 M sucrose + 2% PEG

**Protocol for warming:**

WS1: BECM + 5% EG + 0.57 M sucrose

WS2: BECM + 2.5% EG + 0.29 M sucrose

WS3: BECM + 0.3 M sucrose

WS4: BECM

Figure 1. Vitrification and warming aspects of the microdroplet protocol for cryopreservation of pig embryos. VS, vitrification solution. WS, warming solution. BECM, Beltsville embryo culture medium.



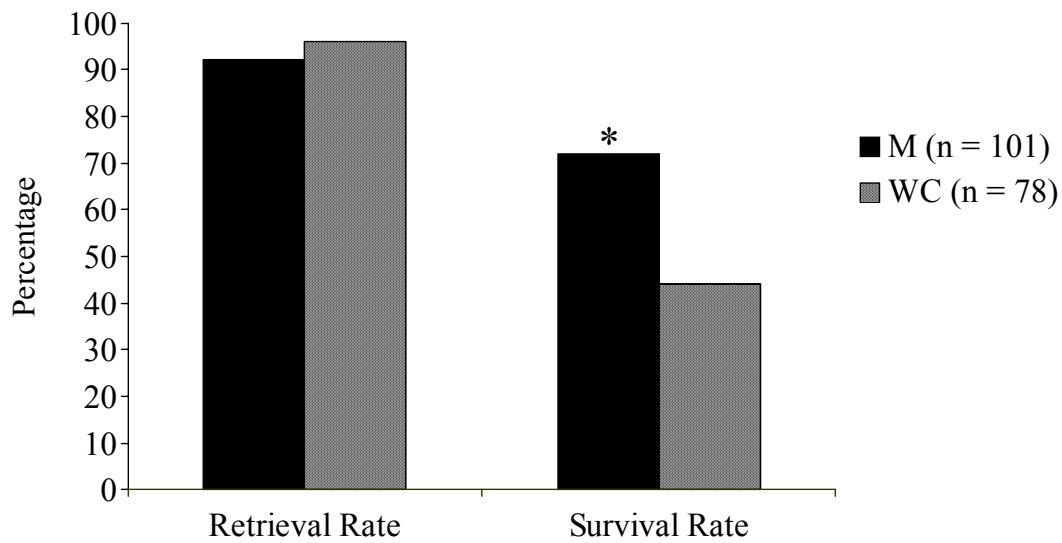


Figure 2. Comparison of embryo retrieval from cryovials (retrieval rate) and survival rate following cryopreservation of M and WC embryos. Embryos were considered to have survived if they advanced a stage in development following 24 h of culture.

\*  $P < .001$  vs. WC.

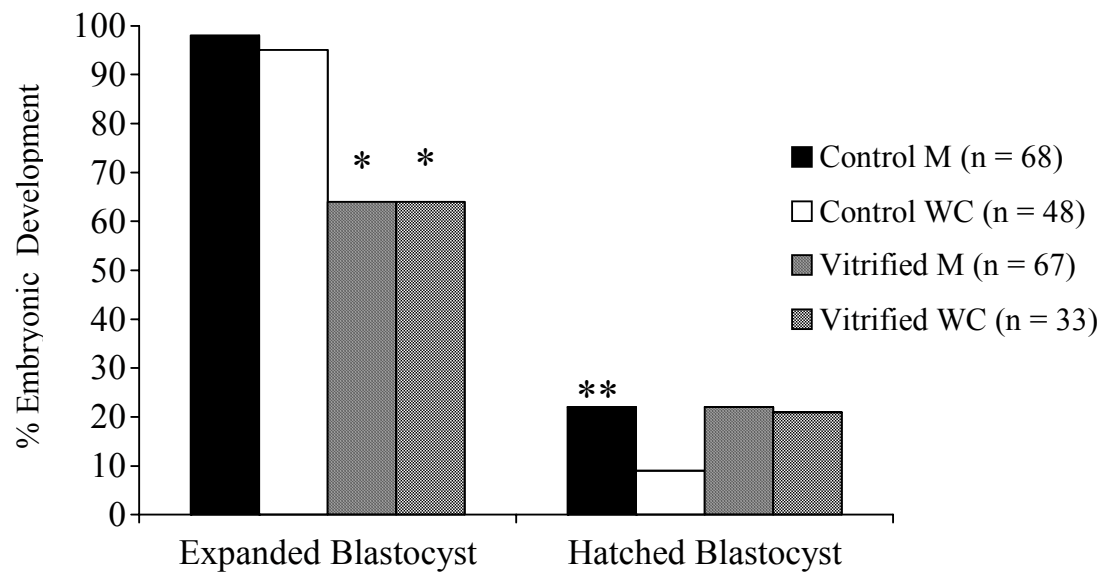


Figure 3. Effect of cryopreservation on development of M and WC embryos *in vitro*.

Cryopreservation decreased expanded blastocyst formation equally for both breeds. \*

$P < .05$  vs. controls. The only breed effect was detected for rates of hatched

blastocyst formation in the control treatment. \*\*  $P < .05$  vs. WC.

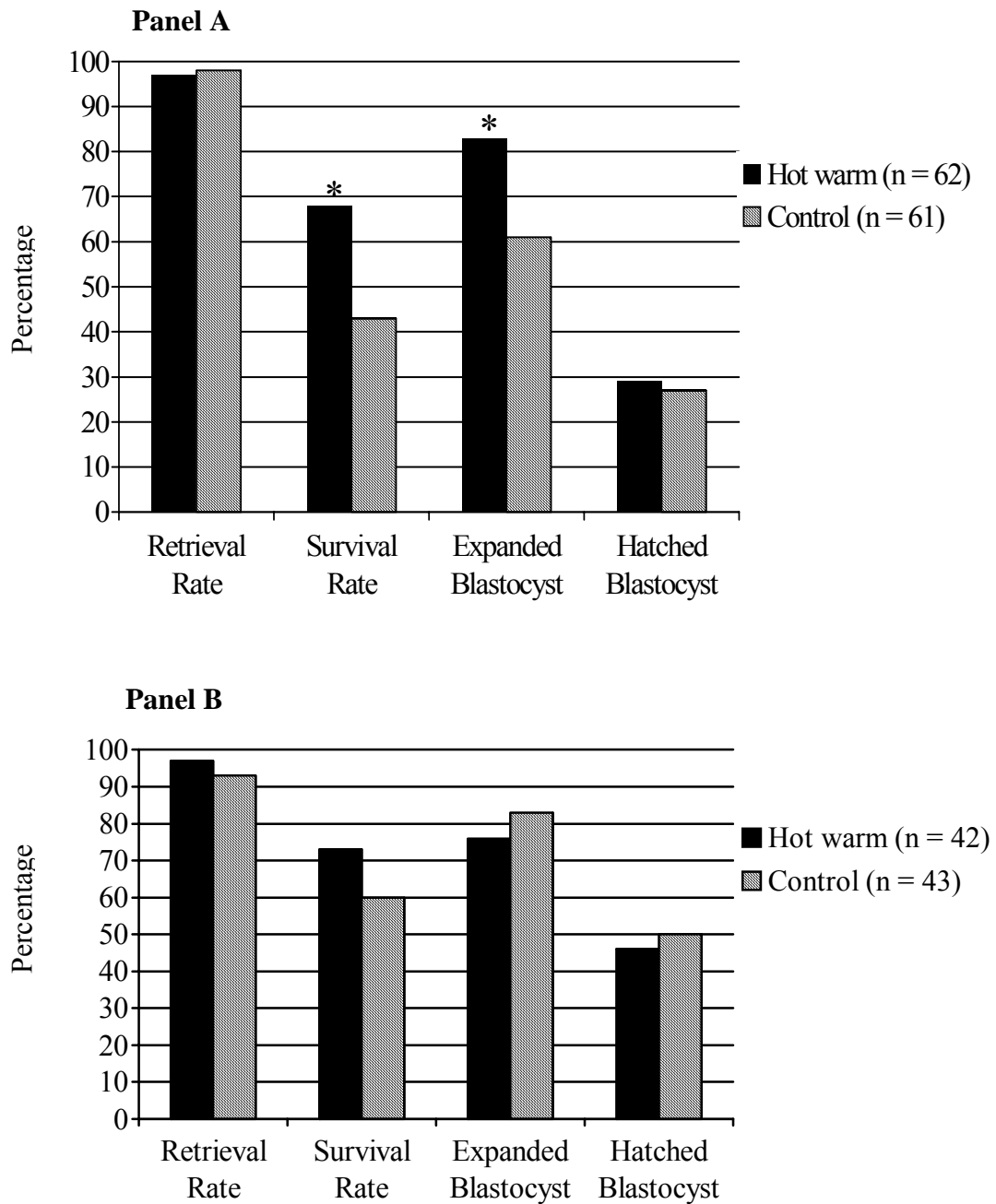


Figure 4. Rates of retrieval, survival and embryonic development of vitrified porcine WC (Panel A) and M (Panel B) embryos warmed using two protocols. \*  $P < .05$  vs. controls.

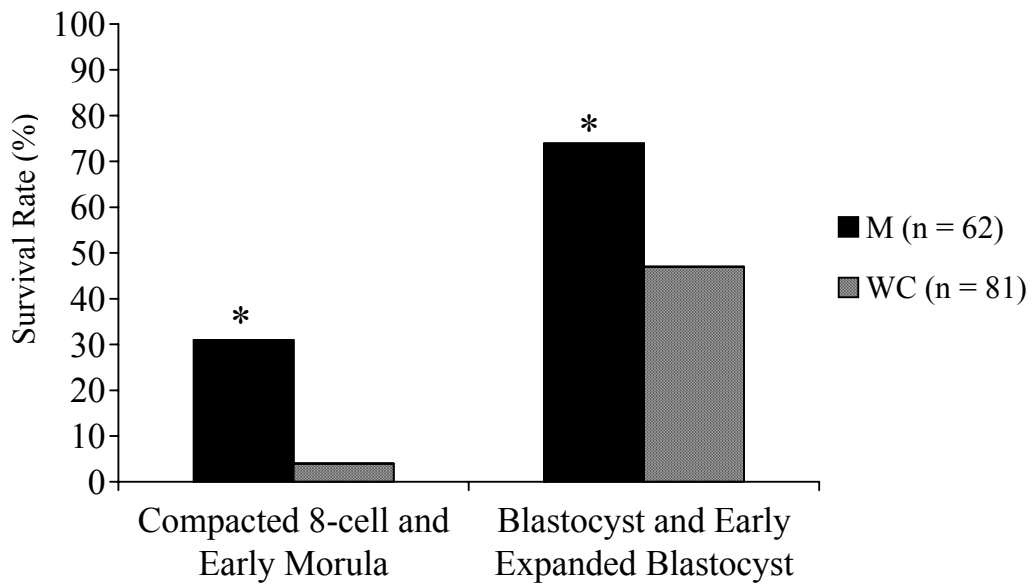


Figure 5. Effect of initial embryonic stage on survival rates of M and WC embryos after cryopreservation. Embryos were considered to have survived if they advanced a stage in development following 24 h of culture. \*  $P < .001$  vs. controls. Consistent with data from Figure 2, the survival rate for M embryos was higher than WC embryos regardless of initial embryonic stage ( $P < .001$ ).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 GnRH no desenvolvimento embrionário precoce

O efeito nulo do GnRH-I, GnRH-II, Des-Gly, Des-Trp e histrelina sobre o desenvolvimento de embriões de camundongos sugere que um mecanismo paracrino é improvável. A evidência de que o GnRH poderia atuar de maneira parácrina nos primeiros dias da embriogênese (HSUEH & JONES, 1981; HARRIS et al., 1991; STOJILKOVIC et al., 1994; PENG et al., 1994; OLOFSSON et al., 1995; CASAN̄ et al., 1998; RAGA et al., 1999; MITWALLY & CASPER, 2002; NEILL, 2002) não foi confirmada neste estudo. No entanto, o desenvolvimento embrionário foi bloqueado com o uso do, GnRH antagonista, SB-75. O mecanismo pelo qual o SB-75 bloqueou o desenvolvimento embrionário não foi totalmente esclarecido. Porém, o fato de que a histrelina parcialmente recuperou o desenvolvimento embrionário sugere que esse efeito inibitório do SB-75 ocorreu devido à ligação específica ao GnRHR (HOFFMANN et al., 2000; MILLAR et al., 2004), bem como por possível “down-regulation” da expressão da proteína e mRNA para GnRHR (SRKALOVIC et al., 1990; HALMOS et al., 1996; LAMHARZI et al., 1998a; KOVACS et al., 2001; KOVACS & SCHALLY, 2001). Ocorrendo, dessa forma, a inibição do efeito autócrino do GnRH, o qual pode ser produzido e secretado pelos embriões no meio de cultivo (SESHAGIRI et al., 1994). A explicação do porquê somente a histrelina, dentre os diferentes análogos de GnRH utilizados, teve capacidade de reversão parcial da inibição do desenvolvimento embrionário pelo SB-75, pode residir no fato de que ambos, o SB-75 e a histrelina, possuem maior potência de ligação ao receptor do que GnRH-I, Des-Gly, Des-Trp (AYALON et al., 1993; MULLER et al., 1994; REISSMANN et al., 2000).

Surpreendentemente, o efeito do GnRH parece ser importante apenas durante os primeiros dois dias de desenvolvimento, sendo que após 42 horas de cultivo o uso de SB-75 não bloqueia o desenvolvimento embrionário. O GnRH é produzido por mórulas e blastocistos em camundongos (RAGA et al., 1999) e humanos (CASAN̄ et al., 1999), bem como em embriões em estádios de pré- e peri-implantação (SESHAGIRI et al., 1994). A presença do GnRH nessas fases mais avançadas guia para a hipótese de que o GnRH é importante em diferentes fases do desenvolvimento embrionário, sendo assim fundamental para as primeiras clivagens, compactação e, provavelmente, está envolvido mais adiante

durante a implantação embrionária. Portanto, o GnRH parece não ter influência na formação do blastocisto.

O conhecimento do efeito do GnRH em células tumorais pode servir como modelo para se interpretar a ação autócrina regulatória essencial do GnRH sobre a embriogênese encontrada no presente estudo. Esse efeito autócrino positivo do GnRH já foi observado anteriormente em células cancerígenas, com estímulo do crescimento e proliferação celular (SEGAL-ABRAMSON et al., 1992; ARENCIBIA & SCHALLY, 2000). Sendo que esse efeito pôde ser inibido com o uso de SB-75 (SEGAL-ABRAMSON et al., 1992) ou anticorpos anti-GnRH (ARENCIBIA & SCHALLY, 2000). Entretanto, muitas vezes a utilização de agonistas do GnRH levaram à inibição do crescimento e proliferação de células tumorais (EMONS et al., 1993; PINSKI et al., 1994; GRUNDKER et al., 2000; XU et al., 2003) e somáticas (KANG et al., 2000). Esses resultados são controversos, mas isso se explica pelo fato de que células tumorais são anormais, podendo variar muito quanto aos fatores envolvidos com a regulação dos mecanismos celulares.

Anteriormente, já foi demonstrado o efeito inibitório do SB-75 sobre a proliferação de células de linhagens tumorais *in vitro* (SEGAL-ABRAMSON et al., 1992; EMONS et al., 1993; KLEINMAN et al., 1994; PINSKI et al., 1994; MANETTA et al., 1995; GRUNDKER et al., 2000; NOCI et al., 2000) e de tumores *in vivo*, independentemente se são esteróides dependentes ou não (RADULOVIC et al., 1993; PINSKI et al., 1994; YANO et al., 1994a; YANO et al., 1994b; JUNGWIRTH et al., 1997; JUNGWIRTH et al., 1998; LAMHARZI et al., 1998b; SZEPEHAZI et al., 1999; CHATZISTAMOU et al., 2001). Ação antiproliferativa do SB-75 durante o desenvolvimento embrionário, encontrada neste trabalho, pode estar associada com a estagnação do ciclo celular na fase G0/G1 (TANG et al., 2002), portanto, futuros estudos devem ser conduzidos para esclarecer melhor a relação entre GnRH e ciclo celular durante os primeiros dias da embriogênese.

O SB-75 pode ter influenciado negativamente nos mecanismos de fatores de crescimento, os quais são importantes para o desenvolvimento embrionário normal. Essa hipótese não foi esclarecida no presente estudo. Mas o SB-75 pode ter interferido com a ação do IGFI e IGF-II (HERSHKOVITZ et al., 1993), pode ter diminuído a quantidade de proteína e mRNA de receptores para EGF (PINSKI et al., 1994; YANO et al., 1994; MORETTI et al., 1996; JUNGWIRTH et al., 1997; MONTAGNANI et al., 1997; JUNGWIRTH et al., 1998; LAMHARZI et al., 1998a; SZEPEHAZI et al., 1999; CHATZISTAMOU et al., 2001), IGF-I (YANO et al., 1994) e IGF-II (LAMHARZI et al., 1998b) nos blastômeros. Por outro lado, o SB-75 pode ter diminuído a ação do EGF, alterando os padrões de fosforilação da tirosina no

receptor (MORETTI et al., 1996; EMONS et al., 1998; GRUNDKER et al., 2000; GRUNDKER et al., 2001) e pela diminuição da expressão da c-fos induzido pelo EGF (MORETTI et al., 1996; MONTAGNANI et al., 1997) resultando em inibição do sinal mitogênico do receptor do EGF e da proliferação celular. Está bem descrito que os sinais intracelulares desencadeados por esses fatores de crescimento envolvem MAP quinases (HUNTER, 1995; PEARSON et al., 2001). Ainda não está claro se os análogos do GnRH atuam sobre os caminhos da MAPK/ERK. No entanto, a ação do GnRH durante o desenvolvimento embrionário pode envolver MAPK/ERK (KIMURA et al., 1999), pois existe o conceito de que a ativação de receptores que se ligam à proteína G pode estimular a cascata da MAPK/ERK (HUNTER, 1995; PEARSON et al., 2001).

O papel da PKC e PKA durante o desenvolvimento embrionário precoce não está completamente entendido e poucos trabalhos foram desenvolvidos para esclarecer isso (SOUSA et al., 1996; GALLICANO et al., 1997a; ELIYAHU et al., 2001; PAUKEN & CAPCO, 2000; CAPCO, 2001). Na presente investigação, o inibidor da PKC diminuiu a formação de mórula e bloqueou a formação de blastocistos. Esse resultado está de acordo com trabalhos prévios em embriões que mostraram a importância da PKC na remodelação da teia de filamentos intermediários (GALLICANO & CAPCO, 1995), compactação (OHSUGI et al., 1993; PAUKEN & CAPCO, 1999; PAUKEN & CAPCO, 2000) e formação de blastocisto (STACHECKI & ARMANT, 1996). Para estudar a cascata inibida pelo SB-75, procurou-se ativar PKC através do uso de forbol éster (PMA, dados não apresentados), porém, o uso de PMA por si só bloqueou o desenvolvimento embrionário. Acredita-se que o efeito negativo do PMA tenha sido devido ao desequilíbrio da complexa regulação das diversas PKCs que estão presentes durante as primeiras clivagens (PAUKEN & GAPCO, 2000). Por isso, provavelmente, seja difícil responder essa questão com o uso de estimuladores das cascatas de PKC ou PKA. Em futuros estudos, acredita-se que a análise por micro arranjo e PCR em tempo real poderão responder quais genes são reprimidos ou estimulados quando o sinal do GnRH é bloqueado, fornecendo informação para melhor se entender esse processo. Outra forma, de responder se o efeito do GnRH em embriões se dá via PKC ou PKA pode ser através da análise por Western blot dos níveis de PKs fosforiladas ou não. Neste trabalho, usando um inibidor da PKA a formação de blastocistos e a percentagem de blastocistos eclodidos foi diminuída, esse efeito pode ter sido pela supressão de uma ótima formação de junções intercomunicantes (OGAWA et al., 2000) e dos mecanismos que envolvem IGF-I durante o desenvolvimento embrionário (MAKAREVICH et al., 2000). Ambas as proteínas quinases, PKC e PKA, mostraram-se essenciais para um desenvolvimento embrionário

normal. Todavia, quando comparamos os perfis das inibições promovidas pelos inibidores da PKC e PKA com a inibição do desenvolvimento embrionário promovida pelo SB-75, pode-se observar que o efeito do SB-75 tem grande similaridade com o efeito do inibidor da PKC e é diferente do efeito do inibidor da PKA. Com isso, é mais provável que o GnRH atue via sinais da PKC do que via PKA.

O GnRH tem sido associado com apoptose em diferentes tecidos. Devido a isso, foi investigado se o efeito do SB-75 sobre o desenvolvimento embrionário se deve à ocorrência de apoptose. A apoptose é um fenômeno que ocorre em embriões e pode levá-los à morte (JURISICOVA et al., 1996; JURISICOVA et al., 1998; LEVY et al., 1998; YANG et al., 1998; BYRNE et al., 1999; LIU et al., 1999; LIU & KEEFE, 2000). A detecção da caspase-3 ativada foi escolhida porque há expressão gênica para essa proteína durante o desenvolvimento embrionário precoce (EXLEY et al., 1999) e todos os caminhos apoptóticos parecem terminar na ativação de proteases da família caspase, sendo a caspase-3 a executora principal da apoptose (ALNEMRI et al., 1994; NICHOLSON et al., 1995; COHEN, 1997; SALVESON & DIXIT, 1997; THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998; CARAMBULA et al., 2002). No presente estudo, não foi encontrada variação nos níveis protéicos da caspase-3 ativada em embriões tratados com SB-75. Dessa forma, parece que o bloqueio do desenvolvimento embrionário pelo SB-75 é efetuado por outro mecanismo anterior à apoptose e o efeito inibitório do GnRH sobre a apoptose, observado em outros tipos celulares (KLEINMAN et al., 1994; ENDO et al., 2003; GUNTHERT et al., 2004; CHEN et al., 2005), não é importante nas primeiras 42 horas de desenvolvimento embrionário.

Baseados em prévios estudos e nos resultados apresentados nesse trabalho, está sendo proposto um modelo para o mecanismo de ação do GnRH no interior do oviduto de mamíferos durante os primeiros dias da embriogênese. O efeito parácrino do GnRH entre oviduto e embriões é improvável, entretanto, o efeito autócrino, durante os dois primeiros dias de vida, é essencial para o desenvolvimento embrionário normal. O mecanismo é mediado pelo GnRHR com ativação da cascata da PKC e interação com mecanismos dos fatores de crescimento, influenciando no ciclo celular, proliferação e compactação.

## **5.2 Vitrificação de embriões suínos**

Desde o início dos anos 70, tem se tentado congelar embriões de suínos, porém, os resultados se mostraram insatisfatórios, principalmente, devido à grande sensibilidade à hipotermia (WILMUT, 1972; POLGE & WILLADSEN, 1978; YOSHINO et al., 1993;



POLLARD & LEIBO, 1994). A partir dos anos 90, experimentos criativos e bem delineados conduziram ao desenvolvimento de protocolos que resultaram em nascimento de leitões normais vivos após vitrificação embrionária (NAGASHIMA et al., 1995a; KOBAYASHI et al., 1998; DOBRINSKY et al., 1999; BERTHELOT et al., 2000; BEEBE et al., 2002). Contudo, para a realização desses protocolos, com resultados satisfatórios, há necessidade de centrifugação dos embriões, estabilização do citoesqueleto e abertura da zona pelúcida.

A nossa observação de que é possível a produção de leitegadas depois da vitrificação de embriões com a zona pelúcida intacta, usando o método microgota, sem estabilização do citoesqueleto e micromanipulação, confirma e expande estudo prévio (MISUMI et al., 2003). O sucesso dos métodos OPS (BERTHELOT et al., 2001; CUELLO et al., 2004b) e microgota pode ser atribuído ao fato de que os embriões passaram a zona perigosa de baixas temperaturas mais rapidamente do que nos métodos convencionais, devido ao aumento da velocidade de resfriamento durante a vitrificação e bem como aumento rápido da temperatura durante o aquecimento.

Os procedimentos até então utilizados para vitrificação de embriões suínos apresentaram muitas variações, principalmente no que se refere ao tipo e concentrações do agente crioprotetor, dos açúcares e macromoléculas. Os crioprotetores podem ser altamente tóxicos para os embriões (WEBER et al., 1992; DOBRINSKI & JOHNSON, 1994; WEBER & YOUNGS, 1994) e a reação do citoesqueleto à vitrificação pode apresentar substancial diferença, dependendo do crioprotetor utilizado (DOBRINSKY, 1997). Os efeitos deletérios podem incluir o rompimento dos microfilamentos durante o tempo de equilíbrio e depois do descongelamento pode ser evidente a lise celular, desagregação, bem como danos à membrana nuclear e celular (DOBRINSKY, 1996). Neste trabalho, ao iniciar o protocolo da microgota, a preocupação foi com a exposição dos embriões ao etilenoglicol (EG). Considerou-se a hipótese de que a exposição ao EG indicado no protocolo da microgota seria extremamente tóxica para os embriões, baseado no conhecimento do efeito tóxico do EG sobre embriões bovinos quando o tempo de equilíbrio para a congelação é longo e executado à temperatura ambiente ou mais elevada.

O presente método recomenda 10 minutos de equilíbrio no meio contendo 10% de EG, 45 segundos no meio de vitrificação com 40% EG, 5 minutos no meio de aquecimento com 5% EG e mais 5 minutos em outro meio com 2,5% EG. Os meios devem ser mantidos a 37°C durante os procedimentos. Portanto, essa pode ser considerada uma exposição longa ao EG, realizada à temperatura bem mais elevada do que a recomendada para bovinos, a qual é de 5 a 15°C. Quando o EG é utilizado para bovinos, tenta-se envasar os embriões o mais

rápido possível e submetê-los a  $-7^{\circ}\text{C}$ , sendo que o tempo de equilíbrio não deve ultrapassar 10 minutos. Os resultados descrevendo o nascimento de leitegadas nesse estudo e por MISUMI et al. (2003) sugerem que os embriões suínos têm maior tolerância à toxicidade do EG do que embriões bovinos. Especulou-se que esse fenômeno se deve ao fato de que o embrião suíno tem muito mais lipídio do que o bovino nos estádios de mórula e blatocisto. Devido a isso, os crioprotetores necessitaram mais tempo em embriões suínos para atingir concentração ótima de equilíbrio no citosol para proteção celular ao congelamento. Se esse é o caso, a característica mais fluida do EG, em comparação com outros crioprotetores como o glicerol, pode ser o segredo dos protocolos OPS e microgota em produzir leitões nascidos a partir de mórulas compactas e blastocistos vitrificados (BERTHELOT et al., 2001; MISUMI et al., 2003). Outra hipótese, é de que o citosol de embriões suínos, por conter mais lipídios e por um mecanismo que deve ser esclarecido, ajuda na maior tolerância à longa exposição e a altas concentrações de EG. Para otimizar os resultados com a técnica da microgota, mais estudos são necessários para se chegar à melhor concentração de crioprotetores e açúcares, tempo de equilíbrio antes dos embriões serem submetidos à solução de vitrificação, bem como o procedimento para aquecimento dos embriões. Acreditamos que, utilizando EG, o tempo de equilíbrio pode ser diminuído significativamente, provavelmente, melhorando os resultados do método microgota. A permanência dos embriões na solução de vitrificação recomendada previamente foi de 30 segundos (MISUMI et al., 2003) ou 1 minuto (BERTHELOT et al., 2001). Na prática, durante a vitrificação, é difícil manter um tempo exato de permanência dos embriões na solução de vitrificação. Baseados nesse estudo e na literatura, pode ser concluído que 30 segundos a 1 minuto na solução de vitrificação parece razoável.

A solução básica pode ter um papel importante nos resultados de sobrevivência depois da vitrificação (BERTHELOT et al., 2000). O meio BECM foi a solução básica no presente trabalho, porém outros têm sido usados: PBS (DOBRINSKY & JOHNSON, 1994; WEBER & YOUNGS, 1994; BERTHELOT et al., 2000), TCM-199 (BERTHELOT, 2001; CUELLO et al., 2004a), pNCSU23 (CAMERON et al., 2004), e M2 (MISUMI et al., 2003). O BECM foi desenhado especificamente para embriões suínos (DOBRINSKY et al., 1996) e provavelmente é o mais indicado para se vitrificar embriões de suínos.

Nos experimentos deste estudo, foram utilizadas concentrações mais baixas de sacarose nos meios de equilíbrio e de vitrificação e maior volume na microgota do que os descritos por MISUMI et al. (2003); porém, o efeito dessas modificações não foi avaliado. No entanto, foi observada vantagem no uso de uma microgota maior de  $5\mu\text{l}$  ao invés de  $1\mu\text{l}$ ,

porque mais embriões podem ser incluídos e o risco de os embriões ficarem retidos dentro da pipeta de vidro é diminuído.

Anteriormente, nunca foi dada atenção para os índices de recuperação embrionária das palhetas, microgota ou criotubos. É fato comum, nos processos de criopreservação os embriões serem perdidos, por isso qualquer método de criopreservação deve ser seguro e fornecer elevados índices de recuperação. O presente método apresentou consistência durante os experimentos, com os índices médios de recuperação variando entre 92 e 98% entre os mesmos. Além do mais, o tipo de criotubo utilizado para estocar os embriões no N<sub>2</sub> líquido, permite fácil manipulação, identificação e alta biosegurança.

Apenas um estudo anterior foi realizado para avaliação da sobrevivência após vitrificação de embriões de raças ocidentais brancas e M (BERTHELOT et al., 2000). BERTHELOT et al. (2000), comparando embriões de hiperprolífico large white (LWh) e M, concluíram que blastocistos LWh (27%) tiveram menor viabilidade do que M (67%), quando os embriões foram congelados em PBS, porém não houve diferença (41% e 43%) quando TCM foi utilizado como solução básica. No mesmo estudo, quando mórulas foram vitrificadas não foi detectada diferença entre as raças e resultados mais baixos de viabilidade após criopreservação foram alcançados (11% para LWh e 14% para M, respectivamente). Contrariamente, no presente estudo foi verificado que os embriões M constantemente apresentaram maior capacidade de sobrevivência à vitrificação do que embriões WC. Neste estudo, essa diferença entre raças foi de quase 30% em todos os estádios embrionários avaliados: 8-célula compacta/mórula inicial, mórula compacta/blastocisto e blastocisto/blastocisto expandido. Entretanto, a partir de embriões que sobreviveram à vitrificação não foi encontrada diferença entre as raças quanto ao desenvolvimento embrionário *in vitro* até os estádios de blastocisto expandido e blastocisto eclodido. Esse achado é intrigante, porque em geral os embriões WC devem possuir algumas características em comum que determinam menor resistência à criopreservação. Por outro lado, embriões WC com habilidade de sobreviver à vitrificação devem possuir perfil celular semelhante aos embriões M, também, sobreviventes.

O procedimento para aquecimento é um passo chave para a sobrevivência embrionária após a criopreservação. Durante esse procedimento, a rehidratação e a velocidade de aquecimento são muito importantes. No novo método de aquecimento proposto nesse trabalho, os embriões são aquecidos na própria microgota e a solução de vitrificação é diluída gradativamente durante alguns segundos, com a adição em quatro etapas da primeira solução de aquecimento. Dessa forma, há evidências de que a rehidratação ocorre mais

vagarosamente do que no protocolo controle (MISUMI et al, 2003). O protocolo hot warm é mais fácil de ser executado do que o controle, principalmente, no momento de procura dos embriões logo após aquecimento.

O desenvolvimento de um método eficiente de criopreservação de embriões suínos nos estádios de 8-células e mórula inicial é importante por motivos práticos quando a transferência de embriões é executada no campo. A criopreservação nesses estádios é possível (NAGASHIMA et al., 1995b; DOBRINSKY et al., 1999), mas esses protocolos envolvem micromanipulação, centrifugação e estabilização do citoesqueleto embrionário. O método de vitrificação microgota se mostrou ineficaz para criopreservação de embriões em estágio de 8-células compacto e mórula inicial. O estágio embrionário no momento da vitrificação apresentou grande efeito sobre os índices de sobrevivência nas duas raças, 40% mais embriões sobreviveram nos estádios de blastocisto/blastocisto expandido do que embriões vitrificados nos estádios 8-células/mórula inicial. Com o método OPS, mórulas suínas se mostraram mais sensíveis à vitrificação do que os blastocistos (BERTHELOT et al., 2000; CUELLO et al. 2004a). É importante ressaltar que embriões suínos podem apresentar compactação no estágio de 8-célula. Esse tipo de embrião pode ser facilmente confundido com mórula ou mórula compacta. Devido a essa peculiaridade, técnicos no campo e pesquisadores devem prestar atenção na diferença entre esses estádios embrionários quando na execução de vitrificação. A avaliação errônea pode levar à interpretação errada dos dados nas pesquisas e a baixos resultados na transferência de embrião na granja caso embriões 8-células ou mórula inicial forem vitrificados.

Blastocistos suínos, em estádios de peri-eclosão, parecem tolerar mais a vitrificação, porque durante essa fase ocorre mudança na composição lipídica e isso pode ser importante no aumento da tolerância à vitrificação (DOBRINSKY, 1996). A alta concentração de lipídios encontrada em embriões de suíno antes da formação da blastocela tem sido considerado o fator principal na falha dos protocolos convencionais de congelação (DOBRINSKY, 1996). NAGASHIMA et al. (1995b), em um estudo inovador, demonstraram o crucial efeito negativo exercido pelos lipídios dos blastômeros nos resultados da criopreservação de embriões suínos nos estádios de 4 a 8-células. O mecanismo e metabolismo lipídico em embriões de suíno é pouco conhecido, bem como as interações e alterações que ocorrem durante a congelação. Nessa área, DOBRINSKY et al. (2000) realizaram trabalho pioneiro e, futuramente, mais esforços precisam ser feitos para aumentar o conhecimento das complexas interações que podem ser danificadas entre microfilamentos,

microtúbulos, lipídios, membranas celular e nuclear, junções do tipo gap e organelas quando embriões suínos são vitrificados.

Em resumo, o presente estudo descreve um método de vitrificação para embriões suínos com a zona pelúcida intacta eficiente para a produção de nascimento de leitões vivos e normais. O procedimento de aquecimento hot warm, pode incrementar os índices de sobrevivência de embriões WC, mas não de embriões M, e é de mais fácil execução. Os estádios ideais para se vitrificar embriões de suíno, usando o método microgota, variam de mórula compacta tardia até blastocisto expandido inicial. Finalmente, os resultados sugerem que embriões Meishan têm mais alta capacidade de sobreviver à vitrificação do que embriões branco cruzado, independentemente do estágio embrionário. Contudo, embriões das duas raças que sobrevivem à vitrificação têm a mesma competência para se desenvolver *in vitro*.

## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou fortes evidências de que o GnRH tem um papel autócrino essencial para o desenvolvimento embrionário precoce em camundongos via GnRHR, provavelmente, pela ativação dos sinais da cascata da PKC e a inibição do sinal do GnRH não ativa mecanismos apoptóticos que envolvem a caspase-3. Com esses resultados, a adição de GnRH ou seus agonistas no meio de cultivo embrionário não se justifica para incrementar os resultados quanto à quantidade e qualidade dos embriões humanos e de animais domésticos obtidos *in vitro*. Gerou-se conhecimento sobre a fisiologia embrionária nos primeiros dias de desenvolvimento. Com a informação de que o GnRH tem função autócrina fundamental durante os primeiros ciclos celulares e que o uso de GnRH antagonista, SB-75, bloqueia o desenvolvimento embrionário, novos métodos anticoncepcionais podem ser criados com impacto na vida de milhões de seres humanos. Esses anticoncepcionais teriam potencial para substituir eventualmente as pílulas tradicionais baseadas em esteróides. Na outra linha de pesquisa sobre vitrificação de embriões suínos, este estudo descreve um método de vitrificação para embriões suínos com a zona pelúcida intacta eficiente para a produção de nascimento de leitões vivos e normais. O procedimento de aquecimento hot warm criado neste trabalho é de fácil execução e pode incrementar os índices de sobrevivência de embriões WC vitrificados pelo método microgota. Os estádios ideais para se vitrificar embriões de suíno, usando o método microgota, variam de mórula compacta tardia até blastocisto expandido inicial. Finalmente, os resultados sugerem que embriões Meishan têm mais capacidade de sobreviver à vitrificação do que embriões WC, independentemente do estágio embrionário. Contudo, embriões das duas raças que sobrevivem à vitrificação têm a mesma competência para se desenvolver *in vitro*. Este estudo, participa de um esforço de quatro décadas para se encontrar um método eficaz, barato, simples e bioseguro de criopreservação de embriões suínos com finalidade de transferência de material genético entre granjas e países. Também, este trabalho contribui para que bancos de germoplasma suíno possam ser formados pela criopreservação de embriões, preservando assim material genético para futuras gerações.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALNEMRI, T. F.; LITWACK, G.; ALNEMRI, E. S. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 49, p. 30761-30764, 1994.

ANDREU-VIEYRA, C. V.; BURET, A. G.; HABIBI, H. R. Gonadotropin-releasing hormone induction of apoptosis in the testes of goldfish (*Carassius auratus*). **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1588-1596, 2004.

ARENCIBIA, J. M.; SCHALLY, A. V. Luteinizing hormone-releasing hormone as an autocrine growth factor in ES-2 ovarian cancer cell line. **International Journal of Oncology**, v. 16, p. 1009-1013, 2000.

AYALON, N. A review of embryonic mortality in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 483-493, 1978.

AYALON, D. et al. Inhibitory effect of highly potent antagonist of LH releasing hormone (SB-75) on the pituitary gonadal axis in the intact and castrated rat. **Neuroendocrinology**, v. 58, p. 153-159, 1993.

BAUER-DANTOIN, A. C.; JAMESON, J. L. Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid receptor expression in the ovary during the rat estrous cycle. **Endocrinology**, v.136, p. 4432-4438, 1995.

BECKMANN, L.S.; DAY, B.N. Effects of media NaCl concentration and osmolarity on the culture of early stage porcine embryos and the viability of embryos cultured in a selected superior medium. **Theriogenology**, v. 39, p. 611-622, 1992.

BEEBE, L. F. S. et al. Piglets born from centrifuged and vitrified early and peri-hatching blastocysts. **Theriogenology**, v. 57, p. 2155-2165, 2002.

BERTHELOT, F. et al. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. **Cryobiology**, v. 41, p. 116-124, 2000.

BERTHELOT, F. et al. Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compact morula stage embryos with intact zona pellucida. **Reproduction and Nutritional Development**, v. 41, p. 267-272, 2001.

BIFULCO, G. et al. Molecular mechanisms involved in GnRH analogue-related apoptosis for uterine leiomyomas. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 43-48, 2004.

BYRNE, A. T. et al. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, n. 1, p. 97-105, 1999.

CAMERON, R. D. A. et al. Farrowing rates and litter size following transfer of vitrified porcine embryos into a commercial swine herd. **Theriogenology**, v. 61, p. 1533-1543, 2004.

CAPCO, D. G. Molecular and biochemical regulation of early mammalian development. **International Review of Cytology**, v. 207, p. 195-235, 2001.

CARAMBULA, S. F. et al. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. **Endocrinology**, v. 143, n. 4, 1495-1501, 2002.

CASAÑ, E. M. et al. Immunoeractive gonadotropin-releasing hormone expression cycling human endometrium in fertile patients. **Fertility and Sterility**, v. 70, n. 1, p. 102-106, 1998.

CASAÑ, E. M.; RAGA, F.; POLAN, M. L. GnRH mRNA and protein expression in preimplantation embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, p. 234-239, 1999.

CASAÑ, E. M. et al. Human oviductal gonadotrophin-releasing hormone: Possible implications in fertilization, early embryonic development, and implantation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 4, p. 1377-1381, 2000.

CHAMSON-REIG, A. et al. Gonadotropin-releasing hormone signaling pathways in an experimental ovarian tumor. **Endocrinology**, v. 144, p. 2957-2966, 2003.



CHATZISTAMOU, I. et al. Inhibition of growth of ES-2 human ovarian cancers by bombesin atagonist RC-3095, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix. **Cancer Letters**, v. 171, p. 37-45, 2001.

CLARKE I. J.; CUMMINS J. T.; KRESTER D. M. Pituitary gland function after disconnection from direct hypothalamic influences in the sheep. **Neuroendocrinology**, v. 36, p. 376-384, 1983.

CLAYTON R. N.; CATT K. J. Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. **Endocrine Reviews**, v. 2, p. 186-209, 1981.

CHEN, W. et al. Gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix down-regulates PCNA and EGF expression and up-regulates apoptosis in association with enhanced PARP expression in cultured human leiomyoma cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n.2, p. 884-892, 2005.

CHRISTENSON, R.K. Ovulation rate and embryonic survival in Chinese Meishan and white crossbred pigs. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 3060-3066, 1993.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemistry Journal**, v. 326, p. 1-16, 1997.

CONN, P. M. The molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary. In: Knobil E., Neil J.D. (eds). **The Physiology of Reproduction**. Raven Press ltd., New York, 1981, p. 1815-1826.

CUELLO, C. et al. Vitrification of porcine embryos at various development stages using different ultra-rapid cooling procedures. **Theriogenology**, v. 62, p. 353-361, 2004a.

CUELLO, C. et al. In vitro development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. **Theriogenology**, v. 62, p. 275-286, 2004b.

DEKEL, N.; LEWYSOHN, O.; AYALON, D. Receptor for GnRH is present in rat oocytes. **Endocrinology**, v. 123, p. 1205-1207, 1988.

DOBRINSKY, J. R.; JOHNSON, L. A. Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: a study of in vitro development. **Theriogenology**, v. 42, p. 25-35, 1994.

DOBRINSKY, J. R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v. 45, p. 17-26, 1996.

DOBRINSKY, J. R.; JOHNSON, L. A.; RATH, D. Development of culture medium (BECM-3) for porcine embryos: Effect of bovine serum albumine and fetal bovine serum on embryo development. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1069-1074, 1996.

DOBRINSKY, J. R. Cryopreservation of porcine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 52, p. 301-312, 1997.

DOBRINSKY, J. R. et al. Cryopreservation of swine embryos with reduced lipid content. **Theriogenology**, v. 51, p. 164, 1999. [resumo].

DOBRINSKY, J. R. et al. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 564-570, 2000.

ELIYAHU, E.; KAPLAN-KRAICER, R.; SHALGI, R. PKC in eggs and embryos. **Frontier of Bioscience**, v. 6, p. 785-791, 2001.

EMONS, G. et al. High affinity binding and direct antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone analogs in human endometrial cancer cell lines. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 77, p. 1458-1464, 1993.

EMONS, G. et al. Effects of LHRH-analogues on mitogenic signal transduction in cancer cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 65, p. 199-206, 1998.

ENDO, F. et al. Protecting spermatogonia from apoptosis induced by doxorubicin using the luteinizing hormone-releasing hormone analog leuprolin. **International Journal of Urology**, v. 10, n. 2, p. 72-77, 2003.

ERBACH, G. T. et al. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 1027-1033, 1994. Erratum in: *Biol Reprod* 1994 Aug; v. 51, n. 2. p. 345.

EXLEY, G. E. et al. Expression of caspase and bcl-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 231-239, 1999.

FUNSTON, R. N.; SEIDEL, J. R. Gonadotropin-releasing hormone increases cleavage rates of bovine oocytes fertilized in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 541-545, 1995.

GALLICANO, G. I.; CAPCO, D. G. Remodeling of the specialized intermediate filament network in mammalian eggs and embryos during development: regulation by protein kinase C and protein kinase M. **Current Topics in Development Biology**, v. 31, p. 277-320, 1995.

GALLICANO, G. I.; YOUSEF, M. C.; CAPCO, D. G. PKC a pivotal regulator of early development. **Biossays**, v. 19, n. 1, p. 29-36, 1997a.

GALLICANO, G. I.; Mc GAUGHEY, R. W.; CAPCO, D. G. Activation of protein kinase C after fertilization is required for remodeling the mouse egg into the zygote. **Molecular Reproduction Development**, v. 46, n. 4, p. 587-601, 1997b.

GALVIN, J.M. et al. Reproductive performance in relation to uterine and embryonic traits during early gestation in Meishan, Large White and crossbred sows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 377-384, 1993.

GRUNDKER, C. et al. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triprorelin and antagonist cetrorelix inhibit EGF-induced c-fos expression in human gynecological cancers. **Gynecological Oncology**, v. 78, p. 194-202, 2000.

GRUNDKER, C.; VOLKER, P.; EMONS, G. Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein  $\alpha_1$ -mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. **Endocrinology**, v. 142, p. 2369-2380, 2001.

GUÉRIN, B. et al. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. **Theriogenology**, v. 47, p. 33-42, 1997.

GUNTHER, A. R. et al. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) inhibits apoptosis induced by cytotoxic agent UV-light but not apoptosis mediated through CD95 in human ovarian and endometrial cancer cells. **Anticancer Research**, v. 24, p. 1727-1732, 2004.

HALMOS, G. et al. Down-regulation of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rats by LH-RH antagonist Cetrorelix. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 93, p. 2398-2403, 1996.

HALMOS, G.; SCHALLY, A. V.; KAHAN, Z. Down-regulation and change in subcellular distribution of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in OV-1063 human epithelial ovarian cancers during therapy with LH-RH antagonist cetrorelix. **International Journal of Oncology**, v. 17, p. 367-373, 2000.

HALMOS, G.; SCHALLY, A. V. Changes in subcellular distribution of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) after treatment with the LH-RH antagonist cetrorelix. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, p. 961-965, 2002.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 919-925, 1997.

HARRIS, N. et al. Gonadotropin-releasing hormone gene expression in MDA-MB-231 and ZR-75-1 breast carcinoma cell lines. **Cancer Research**, v. 51, p. 2577-2581, 1991.

HARRIS, D. et al. Activation of MAPK Cascades by GnRH: ERK and Jun N-Terminal Kinase Are Involved in Basal and GnRH-Stimulated Activity of the Glycoprotein Hormone LH $\beta$ -Subunit Promoter. **Endocrinology**, v. 143, p. 1018-1025, 2002.

HERNANDEZ, E. R. Embryo implantation and GnRH antagonists, the Rubicon for GnRH antagonists. **Human Reproduction**, v. 15, n. 6, p. 1211-1216, 2000.

HERSHKOVITZ, E. et al. Luteinizing hormone-releasing hormone antagonists interfere with autocrine and paracrine growth stimulation of MCF-7 mammary cancer cells by insulin-like growth factors. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 77, p. 963-968, 1993.

HOFFMANN, S. H. et al. Residues within transmembrane helices 2 and 5 of human gonadotropin-releasing hormone receptor contributed to agonist and antagonist binding. **Molecular Endocrinology**, v. 14, p. 1099-1115, 2000.

HSUEH, A. J. W.; JONES, P. B. C. Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. **Endocrine Reviews**, v. 2, n. 4, p. 437-455, 1981.

HUNTER, T. Protein kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling: Review. **Cell**, v. 80, p. 225-236, 1995.

JUNGWIRTH, A. et al. Inhibition on growth of androgen-independent DU-145 prostate cancer in vivo by luteinising hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix and bombesin antagonists RC-3940-II and RC-3950-II. **European Journal of Cancer**, v. 33, p. 1141-1148, 1997.

JUNGWIRTH, A. et al. Inhibition on the growth of Caki-I human renal adenocarcinoma in vivo by luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix, somatostatin analog RC-160 and bombesin antagonists RC-3940-II. **Cancer**, v. 82, p. 909-917, 1998.

JURISICOVA, A.; VARMUZA S.; CASPER, R. F. Programmed cell death and human embryo fragmentation. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, p. 93-98, 1996.

JURISICOVA, A. et al. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p. 243-253, 1998.

KAKAR, S. S. et al. Cloning, sequencing and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 189, n. 1, p. 289-295, 1992.

KANG, S. K. et al. Role of gonadotropin –releasing hormone as an autocrine growth factor in human ovarian surface epithelium. **Endocrinology**, v. 141, p. 72-80, 2000.

KANG, S. K. et al. Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells. **Endocrinology**, v. 142, n. 1, p. 182-192, 2001.

KIMURA, A. et al. Role of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade in gonadotropin-releasing hormone-induced growth inhibition of human ovarian cancer cell line. **Cancer Research**, v. 59, p. 5133-5142, 1999.

KLEINMAN, D. et al. Direct growth inhibition of human endometrial cancer cell by the gonadotropin-releasing hormone antagonist SB-75: role of apoptosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 170, p. 96-102, 1994.

KOBAYASHI, S. et al. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 36, p. 20-31, 1998

KOGO, H. et al. In situ detection of gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor mRNA expression in rat ovarian follicles. **Journal of Experimental Zoology**, v. 272, p. 62-68, 1995.

KOVACS, M.; SCHALLY, A. V. Comparison of mechanisms of action of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist cetrorelix and LHRH agonist triptorelin on gene expression of pituitary LHRH receptors in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 98, p. 12197-12202, 2001.

KOVACS, M. et al. Luteinizing hormone releasing-hormone (LHRH) antagonist Cetrorelix down-regulates the mRNA expression of pituitary receptors for LH-RH by counteracting the

stimulatory effect of endogenous LH-RH. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 98, p. 1829-1834, 2001.

LAMHARZI, N. et al. Decrease in the level and mRNA expression of LH-RH and EGF receptors after treatment with LH-RH antagonist cetorelix in DU-145 prostate tumor xenografts in nude mice. **Interantional Journal of Oncology**, v. 13, p. 429-435, 1998a.

LAMHARZI, N.; SCHALLY, A. V.; KOPPAN, M. Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist cetorelix inhibits growth of DU-145 androgen-independent prostate carcinoma in nude mice and suppress the levels and mRNA expression of IGF-II in tumors. **Regulation Peptide**, v. 77, p. 185-192, 1998b.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEGG, M. Oocyte and zygote zona pellucida permeability to macromolecules. **Journal of Experimental Zoology**, v. 271, n. 2, p. 145-150, 1995.

LEVY, R. et al. Annexin V labelling and terminal transferase-mediated DNA and labelling (TUNEL) assay in human arrested embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 775-783, 1998.

LIU, L.; TRIMARCHI, J. R.; KEEFE, D. L. Thiol oxidation-induced embryonic cell death in mice is prevented by the antioxidant dithiothreitol. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 4, p. 1162-1169, 1999.

LIU, L.; KEEFE, D. L. Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1828-1834, 2000.

LIU, F. et al. GnRH activates ERK1/2 leading to the induction of *c-fos* and LH $\beta$  protein expression in L $\beta$ T2 cells. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 3, p. 419-434, 2002.

LOPES, S.; JURISICOVA, A.; CASPER, R. F. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 13, p. 703-708, 1998.

MAKAREVICH, A. et al. The role of IGF-I, cAMP/protein kinase A and MAP-kinase in the control of steroid secretion, cyclic nucleotide production, granulosa cell proliferation and preimplantation embryo development in rabbits. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 73, n. 3-4, p. 123-133, 2000.

MANETTA, A. et al. Inhibition of growth of human ovarian cancer in nude mice by luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix (SB-75). **Fertility and Sterility**, v. 282-287, 1995.

MAUDSLEY, S. et al. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists promote proapoptotic signaling in peripheral reproductive tumor cells by activating a G $\alpha$  coupling state of the type I GnRH receptor. **Cancer Research**, v. 64, n. 20, p. 7533-7544, 2004.

MILLAR, R. P. et al. Gonadotropin-releasing hormone receptors. **Endocrine Reviews**, v. 25, p. 235-275, 2004.

MINARETZIS, D. et al. Gonadotrophin-releasing hormone receptor gene expression in human ovary and granulosa-lutein cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 80, n. 2, p. 430-434, 1995.

MISUMI, K. et al. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. **Theriogenology**, v. 60, p. 253-260, 2003.

MITWALLY, M. F.; CASPER, R. F. Effect of in vivo GnRH agonist and GnRH antagonist on hCG and insulin-stimulated progesterone production by human granulosa-lutein cells in vitro. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 19, n. 8, p. 384-389, 2002.



MONTAGNANI, M. M. et al. Effects of LHRH agonists on growth of human prostatic tumor cells: in vitro and in vivo studies. **Archives of Italian Urology and Andrology**, v. 69, p. 257-263, 1997.

MORALES, P. Gonadotropin-releasing hormone increases ability of the spermatozoa to bind to the human zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 426-430, 1998.

MORETTI, R. M. et al. Luteinizing hormone-releasing hormone agonists interfere with the stimulatory actions of epidermal growth factor in human prostatic cancer cell lines, LNCaP and DU 145. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, p. 3930-3937, 1996.

MULLER, A. et al. Structural investigation of cetrorelix, a new potent and long-acting LH-RH antagonist. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 43, p. 264-270, 1994.

NAGASHIMA, H. et al. Improved survival of porcine hatched blastocysts cryopreserved with glycerol. **Journal of Reproduction and Development**, v. 41, p. 165-170, 1995a.

NAGASHIMA, H. et al. Cryopreservation of porcine embryos. **Nature**, v. 374, p. 416, 1995b.

NEILL, J. D. Minireview: GnRH and GnRH Receptor Genes in the Human Genome. **Endocrinology**, v.143, p. 737-743, 2002.

NEWTON, A. C. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. **Biochemistry Journal**, v. 370, p. 361-371, 2003.

NOCI, I. et al. Inhibitory effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogues on human endometrial cancer in vitro. **Cancer Letters**, v. 150, p. 71-78, 2000.

NICHOLSON, D. W. et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. **Nature**, v. 376, p. 37-43, 1995.

NY, T. et al. Regulation of tissue-type plasminogen activator activity and messenger RNA levels by gonadotropin-releasing hormone in cultures rat granulosa cells and cumulus-oocyte complexes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 11790-11793, 1987.

OGAWA, H. et al. Regulation of gap junction formation to phosphorylation of connexin43 in mouse preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 4, p. 393-398, 2000.

OHSUGI, M.; OHSAWA, T.; SEMBA, R. Similar responses to pharmacological agents of 1,2-OAG-induced compaction-like adhesion of two-cell mouse embryo to physiological compaction. **Journal of Experimental Zoology**, v. 265, n. 5, p. 604-608, 1993.

OLOFSSON, J. I.; CONTI C. C.; LEUNG, P. C. Homologous and heterologous regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in preovulatory rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 136, p. 974-980, 1995.

ORTMANN, O.; WEISS, J. M.; DIEDRICH, K. Embryo implantation and GnRH antagonists, ovarian actions of GnRH antagonists. **Human Reproduction**, v. 16, n. 4, p. 608-611, 2001.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v. 54, p. 651-658, 2000.

PARBORELL, F. et al. Gonadotropin-releasing hormone antagonist antide inhibits apoptosis of preovulatory follicle cells in rat ovary. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 3, p. 659-666, 2005.

PAUKEN, C. M.; CAPCO, D. G. Regulation of Cell Adhesion During Embryonic Compaction of Mammalian Embryos: Roles for PKC and  $\beta$ -Catenin. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 135-144, 1999.

PAUKEN, C. M.; CAPCO, D. G. The expression and stage-specific localization of protein kinase C isotypes during mouse preimplantation development. **Developmental Biology**, v. 223, n. 2, p. 411-421, 2000.

PEARSON, G. et al. Mitogen-activity protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 153-183, 2001.

PENG, C. et al. Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells. **Endocrinology**, v. 135, p. 1740-1746, 1994.

PINSKI, J. et al. Inhibitory effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone on the growth of the androgen-independent dunning R-3327-AT-1 rat prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v. 59, p. 51-55, 1994.

POLGE, C.; WILLADSEN, S. M. Freezing eggs and embryos of farm animals. **Cryobiology**, v. 15, p. 370-373, 1978.

POLLARD, J. W.; LEIBO, S. P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 101-106, 1994.

RADULOVIC, S. et al. Somatostatin analogue RC-160 and LH-RH antagonist SB-75 inhibit growth of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer xenografts in nude mice. **Pancreas**, v. 8, p. 88-97, 1993.

RAGA, F.; CASAN˜, E. M.; KRUESSEL, J. S. The role of gonadotropin releasing hormone in murine preimplantation embryonic development. **Endocrinology**, v. 140, p. 3705-3712, 1999.

RALL, W.F. & FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryo at -196°C by vitrification. **Nature**, v. 313, p. 573-575, 1985.

RAMA, S.; RAO, A. J. Embryo implantation and GnRH antagonist, the search for the human placental GnRH receptor. **Human Reproduction**, v. 16, n. 2, p. 201-205, 2001.

REED, J. C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. **Nature**, v. 387, p. 773-776, 1997.

REISSMANN, T. et al. The LHRH antagonist cetrorelix: a review. **Human Reproduction**, v. 6, p. 322-331, 2000.

SALVESON, G. S.; DIXIT, V. M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, v. 91, p. 443-446, 1997.

SAS. Statistical Analysis System, SAS 8.2 Cary, NC, USA: Statistical Analysis System Institute, Inc.; 1999-2001.

SEGAL-ABRAMSON, T. et al. Direct effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists and antagonists on MCF-7 mammary cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 89, p. 2336-2339, 1992.

SESHAGIRI, P. B.; TERESAWA, E.; HEARN, J. P. The secretion of gonadotropin-releasing hormone by peri-implantation embryos of the rhesus monkey: comparison with the secretion of chorionic gonadotropin. **Human Reproduction**, v. 9, p. 1300-1307, 1994.

SIFER, C. et al. Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist and follicle stimulating hormone on the incidence of apoptosis in human luteinized granulosa cells. **European Journal of Obstetric and Gynecology Reproductive Biology**, v. 110, n. 1, p. 43-48, 2003.

SOUSA, M.; BARROS, A.; TESARIK, J. Developmental changes in calcium dynamics, protein kinase C distribution and endoplasmatic reticulum organization in human preimplantation embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, n. 12, p. 967-977, 1996.

SRIDARAM, R.; HISHEH, S.; DHARMARAJAN, A. M. Induction of apoptosis by a gonadotropin-releasing hormone agonist during early pregnancy in the rat. **Apoptosis**, v. 3, n. 1, p. 51-57, 1998.

SRKALOVIC, G. et al. Receptors for luteinizing-releasing hormone (LHRH) in dunning R3327 prostate cancer and rat anterior pituitaries after treatment with a sustained delivery system of LHRH antagonist SB-75. **Endocrinology**, v. 127, p. 3052-3060, 1990.

STACHECKI, J. J.; ARMANT, D. R. Regulation of blastocoele formation by intracellular calcium release is mediated through a phospholipase C-dependent pathway in mice. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1292-1298, 1996.

STOJILKOVIC, S. S.; REINHART, J.; KVIN, J. C. Gonadotropin releasing hormone receptor: Structure and signal transduction pathways. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 4, p. 462-499, 1994.

STRINGFELLOW, D. A.; WRATHALL, A. D. Epidemiological implications of the production and transfer of IVF embryos. **Theriogenology**, v. 43, p. 89-96, 1995.

SZEPESHAZI, K. et al. Growth inhibition of experimental pancreatic cancers and sustained reduction in epidermal growth factor receptor during therapy with hormonal peptide analogs. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 125, p. 444-452, 1999.

TANG, X. et al. Cellular mechanisms of growth inhibition of human epithelial ovarian cancer cell line by LH-releasing hormone antagonist cetrorelix. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, p. 3721-3727, 2002.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, p. 1312-1316, 1998.

UEKI, K. et al. Expression of apoptosis-related proteins in adenomyotic uteri treated with danazol and GnRH agonists. **International Journal of Gynecology and Pathology**, v. 23, n. 3, p. 248-258, 2004.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; SOOM, A. V. Structural aspects of zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 463-469, 2000.

VASILYEV, V. V. et al. Different Signaling Pathways Control Acute Induction versus Long-Term Repression of LHB Transcription by GnRH. **Endocrinology**, v. 143, p. 3414-3426, 2002.

VIEYRA, C. V. A.; HABIBI, H. R. Factors controlling ovarian apoptosis. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 78, p. 1003-1012, 2000.

WEBER, P. K.; MCGINNIS, L. K.; YOUNGS, C. R. An evaluation of potential vitrification solutions for cryopreservation for porcine embryos. **Theriogenology**, v. 37, p. 321, 1992. [resumo]

WEBER, P. K.; YOUNGS, C. R. Investigation of cryoprotectant toxicity to porcine embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 1291-1298, 1994.

WHITELAW, P. F. et al. Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the rat ovary. **Endocrinology**, v. 136, p. 172-178, 1995.

WILMUT, I. The low temperature preservation of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 513-514, 1972.

WILMUT, I. et al. A comparison of rate and uniformity of embryo development in Meishan and European white pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 45-56, 1992.

WRATHALL, A. Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. **Theriogenology**, v. 43, p. 81-88, 1995.

XU, J.; LUO, X.; CHEGINI, N. Differential expression, regulation, and induction of smads, transforming growth factor- $\beta$  signal transduction pathway I leiomyoma, and myometrial smooth muscle cells and alteration by gonadotropin-releasing hormone analog. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, p. 1350-1361, 2003.

YANG, H. W. et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Human Reproduction**, v. 13, p. 998-1002, 1998.

YANO, T. et al. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice by treatment with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, p. 7090-7094, 1994a.

YANO, T. et al. Inhibitory effect of bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 and luteinizing hormone-releasing antagonist SB-75 on growth of MCF-7 MIII human breast cancer xenografts in athymic nude mice. **Cancer**, v. 73, p. 1229-1238, 1994b.

YOSHINO, J. et al. Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. **Cryobiology**, v. 30, p. 413-422, 1993.

YOUNGS, C.R.; CHRISTENSON, R.K.; FORD, S.P. Investigations into the control of litter size in swine: III. A reciprocal embryo transfer study of early conceptus development. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 725-731, 1994.

ZANELLA, E. L. et al. GnRH antagonist inhibition of gonadotropin and steroid secretion in boars in vivo and steroid production in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1591-1597, 2000.

ZHAO, S. et al. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist on the incidence of apoptosis in porcine and human granulosa cells. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 49, p. 52-56, 2000.