

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DA DEMECOLCINA NA CINÉTICA DE MATURAÇÃO,  
MICROTÚBULOS E NA ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OÓCITOS  
BOVINOS**

**Naiara Zoccal Saraiva**

Orientador: **Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Fevereiro de 2006

S243e Saraiva, Naiara Zoccal  
Efeitos da demecolcina na cinética de maturação, microtúbulos e na enucleação química de oócitos bovinos / Naiara Zoccal Saraiva. – Jaboticabal, 2006  
xix, 93 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006

Orientador: Joaquim Mansano Garcia

Banca examinadora: Cláudia Lima Verde Leal, Vera Fernanda Hossepian de Lima

Bibliografia

1. Clonagem. 2. Demecolcina. 3. Enucleação química. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.  
e-mail: naiaravet@hotmail.com

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**NAIARA ZOCCAL SARAIVA** – nascida em São Paulo – SP, aos 04 dias do mês de março de 1980; concluiu o ensino médio no Colégio Integrado Esquema Universitário, na cidade de São José do Rio Preto, em dezembro de 1997; ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Estadual de Londrina – UEL, em fevereiro de 1998; concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em fevereiro de 2003; obteve bolsa de Treinamento Técnico pela FAPESP, junto ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da UNESP – Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, de março de 2003 a fevereiro de 2004; ingressou no curso de pós-graduação, em nível de Mestrado, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em março de 2004.

## EPÍGRAFE

"Há aqueles que lutam um dia,  
e por isso são bons;  
Há aqueles que lutam muitos dias,  
e por isso são muito bons;  
Há aqueles que lutam anos, e são melhores ainda;  
Porém , há aqueles que lutam toda a vida,  
esses são imprescindíveis"

(Bertold Brecht)

## DEDICATÓRIA

Dedico a meus pais,  
**Carlos Augusto Saraiva e Izolina Zoccal Saraiva,**  
por todo apoio, carinho, interesse, dedicação  
e principalmente, por sempre acreditarem em mim.  
Sem vocês, sonhos não passariam de sonhos...

Dedico à minha irmã,  
**Onara Zoccal Saraiva,**  
pela amizade, alegria e companheirismo  
em todas as etapas de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador, **Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia**, grande mestre e cientista, pelo idealismo, confiança e ensinamentos transmitidos nesses últimos anos.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da Unesp – Jaboticabal, **Prof. Dr. Cesar Roberto Esper, Profa. Dra. Vera Fernanda Hossepian de Lima, Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini, Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, Prof. Dr. Francisco Guilherme Leite**, pela amizade, interesse e conhecimentos transmitidos.

À **Profa. Dra. Cláudia Lima Verde Leal**, pela disponibilidade e amizade.

Aos funcionários do DRA, **Roberta Vantini, Ivo Luiz de Almeida Jr, Isabel Aparecida Penariol Natarelli e Paulo Sérgio da Silva**, pelo auxílio, boa convivência e amizade.

Aos amigos de laboratório, **Ana Paula Perini, Christina Ramires Ferreira, Danilas Salinet de Melo, Eliana Gazoto, Eric Castro, Felipe Perecin, Giovana D'andrea Pavão, Juliana Corrêa Borges, Letícia Barretto, Lorivaldo Paz Landim Junior, Max Vitória Resende, Simone Cristina Méo Niciura, Tatiane Almeida Drummond Tetzner, Viviane Sgobbi Dias**, pela amizade, auxílio, companheirismo, troca de conhecimentos e muitas risadas. Agradeço a oportunidade de encontrar pessoas maravilhosas como vocês...

Ao amigo **Daniel Penteado Martins Dias**, por participar de várias conquistas minhas, pelo incentivo e aprendizagem nos últimos anos.

Às amigas **Carla Braga, Deborah Furlani Nascimbén, Deborah Penteadó Martins Dias e Raquel Mincarelli Albernaz** pela amizade, carinho e incentivo que sempre me deram. Amiga é amiga...

A todos estagiários que passaram pelo DRA, pelo interesse e auxílio.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal – UNESP**, em especial, ao **Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal** e à **Pós-graduação**, pelas instalações, condições de trabalho, acolhimento e oportunidade.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização desse projeto, tanto com incentivo e auxílio quanto com apoio e amizade.

À minha linda família, por todo o amor, incentivo, compreensão, dedicação e entusiasmo transmitidos.

A Deus, por guiar o meu caminho...

## **APOIO FINANCEIRO**

Esse projeto foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, sob processo nº 03/12351-0, no período de março de 2004 a fevereiro de 2005 e pelo **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq**, no período de março de 2005 a fevereiro de 2006.



## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	xi
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	xiii
<b>ABREVIATURAS.....</b>	xvi
<b>RESUMO.....</b>	xviii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	03
2.1. Ciclo de divisão celular.....	03
2.2. Citoesqueleto e dinâmica de microtúbulos.....	06
2.3. Clonagem de animais.....	09
2.4. Novas técnicas empregadas na clonagem de animais.....	14
2.5. Enucleação química.....	17
2.6. Demecolcina.....	20
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	22
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	23
4.1. Obtenção e maturação de oócitos.....	23
4.2. Experimento I: Influência da concentração de demecolcina na formação de protrusão na região cortical ou enucleação total de oócitos bovinos.....	24
4.2.1 - Oócitos em metáfase I (MI) submetidos ao tratamento com demecolcina.....	24
4.2.2 - Oócitos em metáfase II (MII) submetidos ao tratamento com demecolcina.....	24
4.3. Experimento II: Avaliação da dinâmica nuclear e de microtúbulos de oócitos bovinos submetidos ao tratamento com demecolcina.....	25
4.3.1 - Oócitos em MI submetidos ao tratamento com demecolcina.....	25
4.3.2 - Oócitos em MII submetidos ao tratamento com demecolcina.....	25
4.3.3 – Protocolo para avaliação de imunofluorescência direta de tubulina e cromatina.....	26
4.4. Experimento III: Efeitos da demecolcina sobre a cinética da maturação nuclear e migração dos grânulos corticais em oócitos bovinos.....	26
4.4.1 - Oócitos em MI submetidos ao tratamento com demecolcina.....	26
4.4.2 - Oócitos em MII submetidos ao tratamento com demecolcina.....	27

4.4.3 – Protocolo de coloração de cromatina e grânulos corticais.....	27
4.5. Experimento IV: Eficiência da técnica de enucleação assistida quimicamente pela demecolcina e desenvolvimento embrionário após o procedimento de transferência nuclear.....	28
4.5.1 – Células doadoras de núcleo.....	28
4.5.2 – Obtenção de oócitos e maturação <i>in vitro</i> .....	29
4.5.3 – Sincronização das células doadoras de núcleo.....	29
4.5.4 – Confecção das pipetas de apreensão e injeção.....	29
4.5.5 – Enucleação oocitária.....	30
4.5.6 – Reconstituição por transferência nuclear e eletrofusão.....	31
4.5.7 – Ativação dos oócitos.....	32
4.5.8 – Cultivo e avaliação do desenvolvimento embrionário.....	32
4.6. Análise estatística.....	33
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
5.1. Experimento I: Influência da concentração de demecolcina na formação de protrusão na região cortical ou enucleação total de oócitos bovinos.....	34
5.1.1 - Oócitos em metáfase I (MI) submetidos ao tratamento com demecolcina.....	34
5.1.2 - Oócitos em metáfase II (MII) submetidos ao tratamento com demecolcina.....	37
5.2. Experimento II: Avaliação da dinâmica nuclear e de microtúbulos de oócitos bovinos submetidos ao tratamento com demecolcina.....	41
5.2.1 - Oócitos em MI submetidos ao tratamento com demecolcina.....	41
5.2.2 - Oócitos em MII submetidos ao tratamento com demecolcina.....	46
5.3. Experimento III: Efeitos da demecolcina sobre a cinética da maturação nuclear e migração dos grânulos corticais em oócitos bovinos.....	53
5.3.1 - Oócitos em MI submetidos ao tratamento com demecolcina.....	53
5.3.2 - Oócitos em MII submetidos ao tratamento com demecolcina.....	59
5.4. Experimento IV: Eficiência da técnica de enucleação assistida quimicamente pela demecolcina e desenvolvimento embrionário após o procedimento de transferência nuclear.....	63
5.4.1 - Eficiência da técnica de enucleação.....	63
5.4.2 - Desenvolvimento Embrionário.....	64
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Enucleação (EN) e formação de protrusão (PR) em oócitos bovinos com 12 horas de maturação (MI) expostos a diferentes concentrações (0; 0,025; 0,05; 0,2 e 0,4µg/mL) de demecolcina por 12 horas.....	35
<b>Tabela 2.</b> Valores referentes à formação de protrusão (PR) (média ± dp) em oócitos bovinos em MII (21 horas de maturação) expostos a diferentes concentrações de demecolcina (0; 0,025; 0,05; 0,2 e 0,4µg/mL) por 2 horas.....	38
<b>Tabela 3.</b> Categorias de configuração nuclear e de microtúbulos verificadas após o tratamento de oócitos bovinos em MI (12 horas de maturação) com demecolcina por 0 a 12 horas. 1DNA1MT – oócito em metáfase I com microtúbulos evidentes no mesmo local; 1DNAMTrd – oócito em metáfase I com redução de microtúbulos; 1DNAsMT – oócito em MI sem a presença de microtúbulos.....	42
<b>Tabela 4.</b> Número (porcentagem) de oócitos em MI que atingiram o estágio de metáfase II (MII) após exposição à demecolcina por 12 horas. CON – oócitos do grupo controle; DEME – oócitos expostos à demecolcina.....	53
<b>Tabela 5.</b> Comportamento dos grânulos corticais (GC) [média (DP)] em oócitos bovinos submetidos à demecolcina em MI (12 horas de maturação), avaliados no início e com 2, 4 e 12 horas após o tratamento. CON – oócitos do grupo controle; DEME – oócitos do grupo tratado com demecolcina.....	55
<b>Tabela 6.</b> Número (porcentagem) de oócitos bovinos no estágio metáfase II (MII), antes (GV) e após a maturação (0h) e 2 e 4h após exposição à demecolcina às 21 horas de maturação. CON – oócitos do grupo controle; DEME – oócitos expostos à demecolcina.....	60
<b>Tabela 7.</b> Comportamento dos grânulos corticais (GC) [média (DP)] em oócitos bovinos submetidos à demecolcina após 21 horas de maturação por um período de 2 horas, avaliados no estágio GV, início (0 h), 2 e 4 horas após o tratamento. CON – oócitos do grupo controle; DEME – oócitos do grupo tratado com demecolcina.....	61
<b>Tabela 8.</b> Eficiência da técnica de enucleação (porcentagem) em oócitos bovinos submetidos ao tratamento com demecolcina por 2 h após 19 horas de maturação.....	64
<b>Tabela 9.</b> Número (porcentagem) de oócitos bovinos expostos à demecolcina por 2 horas após 19 horas de maturação e enucleados após seleção de CP ou	

protrusão em microscópio estereoscópico..... 64

**Tabela 10.** Taxa (porcentagem) de reconstituição, fusão e lise em embriões bovinos submetidos ao procedimento de transferência nuclear com a técnica de enucleação assistida quimicamente pela demecolcina..... 65

**Tabela 11.** Avaliação da taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto em embriões bovinos reconstituídos por transferência nuclear (TN) após procedimento de enucleação assistida quimicamente pela demecolcina..... 65

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Fotomicrografias de grânulos corticais (GC) em oócitos bovinos durante o processo de MIV. (a) GC dispostos em “clusters” no interior do oócito (oócito imaturo); (b) GC em transição, dispostos tanto no centro quanto na periferia do oócito (transição imaturo/maturo); (c) GC dispostos na periferia do oócito, logo abaixo da membrana vitelínica (oócito maturo). Os oócitos foram corados com lecitina (específica a $\alpha$ -D-manose) conjugada a FITC e avaliados sob microscopia de epifluorescência.....	28
<b>Figura 2.</b> Fotomicrografias de oócitos bovinos tratados com demecolcina em MI e avaliados após 24 horas de maturação, por coloração com Hoechst 33342. (a) Oócito com formação de protrusão na região cortical (indicada pela seta), contendo todo o material nuclear; (b, c) Oócitos com enucleação total, com toda a cromatina condensada junto ao 1º CP (setas indicam o 1º CP contendo todo o material nuclear).....	34
<b>Figura 3.</b> Representação gráfica da porcentagem de oócitos com protrusão (PR) e enucleação completa (EN) após o tratamento de oócitos bovinos em MI com diferentes concentrações de demecolcina por um período de 12 h, completando-se 24 h de maturação. EN – oócitos enucleados; PR – oócitos com protrusão.....	35
<b>Figura 4.</b> Fotomicrografias de oócitos bovinos em metáfase II (MII) expostos à demecolcina por 2 horas, com formação de protrusão na região cortical (indicada pela seta): presença do 1º CP e protrusão observados com (a) ou sem (b) fluorescência. Protrusão bem próxima ao CP (c); formação de protrusão em oócitos sem CP (d).....	38
<b>Figura 5.</b> Representação gráfica da porcentagem de oócitos bovinos com protrusão (PR) expostos em MII a diferentes concentrações de demecolcina por um período de 2 h.....	39
<b>Figura 6.</b> Fotomicrografias de oócitos bovinos tratados em metáfase I (MI) com demecolcina (Avaliação da dinâmica nuclear e de microtúbulos). Categorias de oócitos encontradas: (a,b) 1DNA1MT – oócito em metáfase I com microtúbulos evidentes no mesmo local; (c,d) 1DNAMTrd – oócito em metáfase I com redução de microtúbulos; (e,f) 1DNAsMT – oócito em MI sem a presença de microtúbulos. (a,c,e) Oócitos corados com Hoechst 33342; (b,d,f) oócitos corados com anticorpo anti- $\alpha$ tubulina (1:50) conjugado a FITC, observados em microscópio de epifluorescência. As setas indicam material nuclear (azul) e microtúbulos (verde).....	42

**Figura 7.** Representação gráfica da dinâmica nuclear e de microtúbulos de oócitos bovinos pertencentes (a) ao grupo controle (não tratado) e (b) ao grupo deme (expostos à demecolcina em MI por um período de 12 horas) avaliados a intervalos de 0,5 h nas primeiras 2 h de tratamento e após 4 e 12 h. 1DNA1MT – oócito em metáfase I com microtúbulos evidentes no mesmo local; 1DNAMTrd – oócito em metáfase I com redução de microtúbulos; 1DNAsMT – oócito em MI sem a presença de microtúbulos..... 43

**Figura 8.** Fotomicrografias de oócitos bovinos expostos à demecolcina em metáfase II (MII) e avaliados quanto à dinâmica nuclear e de microtúbulos. Categorias de oócitos encontradas: (a,b) MII – oócito em metáfase II com microtúbulos evidentes tanto no citoplasma do oócito quanto no corpúsculo polar; (c,d) AI/II – oócito em transição anáfase/telófase I com fuso meiótico evidente; (e,f) 2DNA1MT – oócito em MII com microtúbulos evidentes em apenas um local; (g,h) 2DNAMTrd – oócito em MII com redução de microtúbulos; (i,j) 2DNAsMT – oócito em MII sem a presença de microtúbulos; (k,l) 1DNA1MT - oócito em metáfase I com microtúbulos evidentes no mesmo local. (a,c,e,g,i,k) Oócitos corados com Hoechst 33342; (b,d,f,h,j,l) oócitos corados com anticorpo anti- $\alpha$  tubulina (1:50) conjugado a FITC, observados em microscópio de epifluorescência. As setas indicam material nuclear (azul) e microtúbulos (verde)..... 48

**Figura 9.** Fotomicrografias de oócitos bovinos submetidos ao tratamento com demecolcina em MII por 2 horas, avaliados após 8 horas do início do tratamento (6 horas em meio livre de droga) apresentando fragmentação de DNA (categoria DNAfrag; a-c). Os oócitos foram corados com Hoechst 33342 e observados em microscópio de epifluorescência..... 48

**Figura 10.** Representação gráfica da dinâmica nuclear e de microtúbulos de oócitos bovinos do (a) grupo controle e do (b) grupo deme (expostos à demecolcina em MII por um período de 2 horas) avaliados a intervalos de 0,5 h nas primeiras 2 h de tratamento e após 4 e 8 h (em meio livre da droga). MII – oócito em metáfase II com microtúbulos evidentes tanto no citoplasma do oócito quanto no corpúsculo polar; AI/II – oócito em transição anáfase/telófase I com fuso meiótico evidente; 2DNA1MT – oócito em MII com microtúbulos evidentes em apenas um local; 2DNAsMT – oócito em MII sem a presença de microtúbulos..... 49

**Figura 11.** Representação gráfica da porcentagem de oócitos bovinos em metáfase II (com maturação nuclear) após o tratamento de oócitos em MI com demecolcina por um período de 12 h, completando-se 24 h de maturação. CON – oócitos do grupo controle; DEME – oócitos expostos à demecolcina..... 54

**Figura 12.** Aspecto visual de oócitos bovinos após 24 horas de maturação *in vitro* no grupo controle (a) e no grupo tratado com demecolcina por 12 horas

(b), mostrando incompleta expansão das células do *cumulus* no grupo tratado. 54

**Figura 13.** Distribuição de grânulos corticais em oócitos bovinos do grupo controle e do grupo deme (oócitos expostos à demecolcina em MII por um período de 12 horas) avaliados a intervalos de 2 h durante as primeiras 4 h e após 12 h de exposição à droga..... 55

**Figura 14.** Representação gráfica da porcentagem de oócitos bovinos em metáfase II (com maturação nuclear) no estágio GV e após o tratamento desses, em MII, com demecolcina, nos momentos 0, 2 e 4 h. CON – oócitos do grupo controle; DEME – oócitos expostos à demecolcina..... 60

**Figura 15.** Representação gráfica da distribuição de grânulos corticais em oócitos bovinos do grupo controle e do grupo deme (oócitos expostos à demecolcina após 21 horas de maturação por um período de 2 horas) avaliados em GV e em intervalos de 2 h até 4 h após o início do tratamento..... 61

**Figura 16.** Fotomicrografias de oócitos bovinos submetidos ao tratamento com demecolcina por 2 horas, após 19 horas de maturação, antes do procedimento de enucleação. (a) formação de protrusão próxima ao 1º CP. A seta indica a protrusão formada; (b) área translúcida com leve protuberância na região cortical próxima ao CP. A seta indica a formação da protuberância... 63

AI	Anáfase I
AII	Anáfase II
AI/II	Transição Anáfase/Telófase I
ANOVA	Análise de Variância
BSA	Albumina Sérica Bovina
° C	Graus Celsius
CDKs	Cinases Dependentes de Ciclinas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CP	Corpúsculo Polar
CSF	Fator Citostático
D.E.	Diâmetro Externo
D.I.	Diâmetro Interno
6-DMAP	6-Dimetilaminopurina
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
EN	Enucleado
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
G	Gauge
GC	Grânulos corticais
GV	Vesícula Germinativa
GVBD	Ruptura da Vesícula Germinativa
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HSOF	Meio SOF com Tampão Hepes
MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitógeno
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIII	Metáfase III
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mg	Miligramas
mL	Mililitro
MLI	Meio de lavagem e incubação
mm	Milímetro
mM	Milimol
Mos	Produto do Proto-oncogene c-mos
MPF	Fator Promotor de Maturação
PBS	Tampão Salina Fosfato
POI	Puro de Origem Indiana
PR	Protrusão
RNAm	Ácido Ribonucléico Mensageiro
SAS	“Statistical Analysis System”
SB	Solução de Bloqueio
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Meio de cultivo “Synthetic Oviduct Fluid”
TCM	“Tissue Culture Medium”
TI	Telófase I
TII	Telófase II
TN	Transferência Nuclear
UV	Ultra-Violeta
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µM	Micromol
µseg	Microsssegundo



## EFEITOS DA DEMECOLCINA NA CINÉTICA DE MATURAÇÃO, MICROTÚBULOS E NA ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OÓCITOS BOVINOS.

**RESUMO** – O objetivo desse estudo foi avaliar a ação da demecolcina na composição de microtúbulos, maturação e desenvolvimento *in vitro* de oócitos bovinos, submetidos ao tratamento em metáfase I (MI) e metáfase II (MII). No experimento I, observamos que a concentração 0,05µg/mL foi a mais eficaz na indução de enucleação no grupo MI (15,2%) e na formação de protrusão no grupo MII (55,1%). No experimento II, verificamos manifestações da demecolcina em apenas 0,5 h de tratamento, pelo aumento significativo de categorias de oócitos sem microtúbulos. Houve nova polimerização dessas estruturas, quando oócitos expostos à droga em MII, foram cultivados em meio livre desse agente. No experimento III, evidenciamos influência negativa da demecolcina na maturação nuclear de oócitos tratados em MI, durante 12 horas (4,9% de oócitos em MII) e um diferente comportamento quanto à distribuição de grânulos corticais (GC); enquanto no grupo MI houve tendência à antecipação na migração de GC para a periferia, após 2 horas de exposição à droga, no grupo MII, observou-se nesse momento, ação prejudicial da mesma. Ainda, verificamos incompleta expansão das células do *cumulus* em oócitos expostos à demecolcina por 12 horas. No experimento IV, obtivemos alta eficácia da técnica de enucleação (90,6%) e grande variação quanto ao desenvolvimento até o estágio de blastocisto (12,5 a 47%), não verificando-se ação prejudicial da droga no desenvolvimento embrionário.

**Palavras-chave:** bovino, clonagem, demecolcina, enucleação química, microtúbulos, oócito.

## DEMECOLCINE EFFECTS ON KINETICS OF MATURATION, MICROTUBULES AND CHEMICAL ENUCLEATION OF BOVINE OOCYTES

**SUMMARY** - The aim of this study was to evaluate demecolcine action on microtubules composition, maturation and *in vitro* development of bovine oocytes, submitted to the treatment in metaphase I (MI) and metaphase II (MII). In the experiment I, we observed that 0.05µg/mL was the most efficient concentration to induce the enucleation in group MI (15.2%) and protrusion formation in group MII (55.1%). In experiment II, we verified demecolcine manifestations already after 0.5 hour of treatment, supported by the significant increase of categories of oocytes without microtubules. There was new polymerization of these structures when oocytes exposed to the drug in MII were cultured in agent-free medium. In experiment III, we evidenced negative influence of demecolcine on nuclear maturation of oocytes treated on MI for 12 hours (4.9% of oocytes in MII) and a different behavior for cortical granules (CG) distribution; while in MI group there was a tendency for the anticipation of CG migration to periphery, after 2 hours of drug exposition, in the MIII group, was observed a harmful effect of the drug. Moreover, we verified incomplete expansion of *cumulus cells* in oocytes exposed to demecolcine for 12 hours. In experiment IV, we got high effectiveness of enucleation technique (90.6%) and wide variation for development to the blastocyst stage (12.5 to 47%), and no harmful effects of the drug on embryonic development were observed.

**Keywords:** bovine, cloning, demecolcine, chemical enucleation, microtubules, oocytes

## 1. INTRODUÇÃO

Nos mamíferos domésticos, o aumento dos índices produtivos bem como a maior disseminação de material genético de qualidade superior, nos rebanhos, têm sido objeto de intensos estudos e investimentos. Desde o relato do nascimento da ovelha “Dolly” (WILMUT et al., 1997), a clonagem passou a ser uma das biotécnicas mais discutidas e estudadas, com crescente interesse tanto da comunidade científica como da indústria, que pode ser explicado pela sua aplicação na produção de animais geneticamente idênticos, multiplicação de indivíduos superiores, preservação de espécies ameaçadas de extinção, produção de órgãos e tecidos para xenotransplantes (clonagem terapêutica) e obtenção de biorreatores.

Dois componentes celulares são essenciais para a produção de um clone: o núcleo doador (carioplasto) e o oócito enucleado receptor (citoplasto), cuja constituição citoplasmática deve ser suficientemente competente para permitir a reprogramação do núcleo e dar suporte ao desenvolvimento a termo. Portanto, a enucleação oocitária é um fator chave que determina o sucesso da clonagem de animais (IBÁÑEZ et al., 2003).

O procedimento de enucleação na TN tradicional é invasivo e envolve a coloração do núcleo com Hoechst 33342 com aspiração do 1º CP e placa metafásica adjacente utilizando-se irradiação UV para que a enucleação seja confirmada. A irradiação UV causa significativa diminuição no desenvolvimento de embriões ao estágio de blastocisto, principalmente devido à indução de alterações de membrana e componentes intracelulares de oócitos bovinos (SMITH, 1993) e de defeitos causados na cromatina (DOMINKO et al., 2000). Ainda, o fluorocromo Hoechst 33342, que possui um comprimento de onda curto (excitação 350nm), transfere grande quantidade de energia ao material biológico sob excitação (DOMINKO et al., 2000).

A injúria causada ao oócito receptor é agravada pela remoção concomitante de grande volume de citoplasma ao redor da placa metafásica durante o procedimento de enucleação, uma vez que esse citoplasto contém RNAm, proteínas e precursores moleculares essenciais ao desenvolvimento inicial até a ativação do genoma

embrionário (BARNES e EYESTONE, 1990). Ainda, o procedimento de enucleação é um evento crucial para a clonagem devido à eliminação de qualquer contribuição genética do citoplasma receptor. Rotineiramente, a enucleação pode resultar em 30% de DNA residual nos citoplastos (LI et al., 2004).

Vários procedimentos que facilitam a enucleação têm sido relatados. Um dos métodos consiste na remoção dos cromossomos maternos durante a formação do primeiro corpúsculo polar após a ativação com etoposídeo e cicloheximide (FULKA e MOOR, 1993). A enucleação química é um procedimento não-invasivo muito atrativo por causar mínima diminuição do volume citoplasmático, porém, esses autores afirmam que o tratamento de oócitos bovinos em metáfase I, com o mesmo protocolo utilizado em murinos (etoposídeo e cicloheximide), não proporciona bons resultados.

Outro método é a enucleação oocitária assistida quimicamente pela administração de demecolcina, um agente que desestrutura microtúbulos, auxiliando a enucleação oocitária devido à interferência na função do fuso meiótico. Estudos têm revelado altas taxas de enucleação com o uso da demecolcina (YIN et al., 2002a,b; IBÁÑEZ et al., 2003; KAWAKAMI et al., 2003; PEURA, 2003; LI et al., 2004; VAJTA et al., 2004), porém, os efeitos da demecolcina em oócitos bovinos, tanto no processo de maturação quanto sua ação direta na composição de microtúbulos, ainda não foram avaliados. Dessa maneira, um estudo a respeito das conseqüências temporais da demecolcina em oócitos expostos à droga, tanto em metáfase I como em metáfase II, e vantagens obtidas em relação aos procedimentos convencionais trará grande contribuição na expansão da biotecnologia de clonagem de animais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Ciclo de divisão celular

Em espécies unicelulares, tais como bactérias e leveduras, cada divisão celular produz um organismo adicional. Em espécies multicelulares, diversos ciclos de divisão celular são requeridos e a divisão celular é necessária, inclusive no indivíduo adulto para substituir as células que são danificadas, funcionalmente deficientes ou perdidas por morte celular programada. A maioria das células também duplica seu volume e suas organelas citoplasmáticas em cada ciclo celular. Portanto, uma complexa série de processos nucleares e citoplasmáticos ocorre durante o ciclo celular, exigindo perfeita coordenação entre eles (ALBERTS et al., 2002).

As tradicionais subdivisões do ciclo celular são  $G_1$ , S,  $G_2$  e M. A replicação do DNA nuclear ocupa somente uma parte da intérfase, chamada fase S do ciclo celular. O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA é chamado de fase  $G_1$  e o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é chamado de fase  $G_2$ . As fases  $G_1$  e  $G_2$  propiciam tempo adicional para o crescimento celular. Células em  $G_1$  ainda não comprometidas com a replicação de DNA podem interromper seu crescimento durante o ciclo e passar para um estado especializado de repouso, freqüentemente chamado de  $G_0$ , no qual podem permanecer por dias, semanas ou mesmo anos antes de retornar a proliferar (ALBERTS et al., 2002).

Os ciclos de divisão eucariótica mais curtos conhecidos são os ciclos de células embrionárias nos estádios iniciais. Não ocorre crescimento algum durante esses ciclos, as fases  $G_1$  e  $G_2$  estão drasticamente encurtadas e o tempo de uma divisão até a seguinte está em torno de 8 a 60 minutos, dos quais metade é gasto com a fase S e metade com a fase M (ALBERTS et al., 2002). A meiose é um exemplo particular da divisão celular que ocorre em células germinativas. Esse ciclo celular especializado consiste em duas etapas sucessivas de segregação cromossômica seguintes a um ciclo de replicação de DNA (DEKEL, 1995).

Após o processo de crescimento celular e redistribuição das organelas citoplasmáticas, as células germinativas primordiais se multiplicam ativamente no ovário e são transformadas em oogônias. Ao final da vida pré-natal, os oócitos entram no estágio diictiôteno, no qual permanecem até próximo à ovulação, quando retomam a meiose (GORDON, 1994). Portanto, a maioria dos oócitos de anfíbios e mamíferos fica estacionada no estágio de vesícula germinativa na prófase da primeira divisão meiótica e, sob estímulo apropriado, ocorre a retomada da meiose com quebra da vesícula germinativa, término da primeira divisão meiótica e nova parada do oócito em metáfase da segunda divisão meiótica. Nessa fase, o oócito maduro está apto a ser fecundado. Após a fecundação, a segunda divisão meiótica é completada com a extrusão do segundo corpúsculo polar. As cromatinas feminina e masculina descondensam-se e dois pronúcleos são formados, nos quais tem início a replicação do DNA. Posteriormente, ocorre a segregação do material genético por meio de mitose com a clivagem do zigoto em dois blastômeros (CAMPBELL et al., 1996).

Entre os reguladores do ciclo celular, as cinases dependentes de ciclinas (CDKs) exercem papel central no início e na ordenação dos eventos de divisão celular, regulando a progressão das fases  $G_1$ , S,  $G_2$  e M (KNOCKAERT et al., 2002).

A família das proteínas cinases dependentes de ciclina induz processos que requerem a fosforilação de serinas e treoninas em proteínas-alvo apropriadas. A formação, ativação e separação dos complexos ciclina-CDK são eventos fundamentais que coordenam o ciclo celular. As ciclinas são assim chamadas porque elas sofrem um ciclo de síntese e degradação em cada ciclo de divisão celular. Existem duas classes principais de ciclinas: as ciclinas mitóticas, que se ligam às moléculas de CDK durante  $G_2$  para iniciar a mitose, e as ciclinas  $G_1$ , que se ligam às moléculas de CDK durante  $G_1$  e são requeridas para o início da fase S (ALBERTS et al., 2002).

A manutenção do oócito em meiose deve-se à persistência, em níveis elevados, das seguintes proteínas cinases: fator promotor de maturação (MPF), proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e fator citostático (CSF ou Mos – produto do proto-oncogene c-mos). O MPF é um dímero protéico formado pela ciclina B1 (subunidade regulatória) e pela proteína p34<sup>cdc2</sup> (subunidade catalítica) (YANG et al., 1994; HOMA,

1995). O MPF promove fosforilação das laminas, que são algumas das proteínas que compõem a lâmina nuclear, com conseqüente ruptura do envelope nuclear, e das histonas, desencadeando condensação cromossômica (MEIJER e PONDAVEN, 1988). Os fusos se organizam e os cromossomos se prendem ao fuso via proteínas especializadas que se formam nos centrômeros, os cinetocoros. A integridade do sistema é necessária para que ocorra a correta segregação dos cromossomos. Durante a metáfase, a distância entre os pólos do fuso diminui assim como esse se torna progressivamente mais compacto (STEIN et al., 1999). O CSF bloqueia a degradação da ciclina B, permitindo assim, a persistência do MPF (YANG et al., 1994; HOMA, 1995). Além disso, o CSF ativa a MAPK (HIRAO e EPPIG, 1997; LIU et al., 1998), que é responsável pela manutenção do fuso meiótico (VERLHAC et al., 1994).

Uma coordenação precisa das fases do ciclo celular é crítica não somente para a divisão normal da célula, mas também, para uma eficiente parada do crescimento sob condições de “stress” ou após dano ao DNA. O MPF é inativado rapidamente pela degradação da ciclina mitótica no limite das fases metáfase-anáfase, permitindo que a célula saia da mitose (ALBERTS et al., 2002).

O espermatozóide, ao fecundar o oócito maturo, promove elevações transitórias e periódicas de cálcio livre intracelular (YANG et al., 1994), que resultam na indução da reação cortical, retomada da meiose e formação dos pronúcleos (KUPKER et al., 1998). O aumento do cálcio livre intracelular inativa o CSF e promove destruição da ciclina, resultando na inativação do MPF (WHITE e YUE, 1996), que por sua vez, permite a ocorrência, no oócito, dos eventos iniciais da ativação, que se dividem em nucleares: retomada da meiose, transição anáfase/telófase, extrusão do segundo corpúsculo polar, e citoplasmáticos: exocitose dos grânulos corticais, com conseqüente endurecimento da zona pelúcida e bloqueio à polispermia. Entretanto, se o estímulo é insuficiente, não há inativação da MAPK e a atividade do MPF volta a ser restabelecida, determinando a entrada do oócito em nova metáfase, denominada metáfase III (MIII) (ARAKI et al., 1996; LIU et al., 1998).

Como demonstrado por SZÖLLOSI et al. (1988), o completo remodelamento do núcleo transferido depende absolutamente de uma exposição inicial a altos níveis de

MPF, que é degradado após a ativação e suas concentrações declinam bruscamente. De acordo com BORDIGNON e SMITH (1998), a remoção de cromossomos de oócitos ativados no estágio de telófase também é efetiva, mas a baixa atividade do MPF pode diminuir a viabilidade dos mesmos. Ainda, segundo ELSHEIKH et al. (1997) e LEAL et al. (1999), a irradiação com ultravioleta, utilizada em procedimentos de enucleação tradicionais, também afeta o MPF.

## **2.2. Citoesqueleto e dinâmica de microtúbulos**

A capacidade que as células eucarióticas possuem de adotar uma variedade de formas e executar movimentos coordenados e direcionados depende de uma rede complexa de filamentos de proteínas, chamada de citoesqueleto, que se estende por todo o citoplasma. As diferentes atividades do citoesqueleto dependem de três tipos de filamentos protéicos: filamentos de actina (microfilamentos), microtúbulos e filamentos intermediários.

Os microtúbulos (MTs) são estruturas polares, que apresentam uma das extremidades ancorada no centrossomo e a outra, livre no citoplasma (ALBERTS et al., 2002). Os MTs, estruturas altamente dinâmicas, podem aumentar ou diminuir em comprimento pela adição ou perda de subunidades de tubulina, que são heterodímeros constituídos de dois polipeptídeos tubulares lobulares fortemente ligados. A polimerização e a despolimerização dos microtúbulos é um processo complexo, com funções biológicas importantes. A polimerização mostra uma fase inicial de latência, seguida pela rápida formação de microtúbulos (alta concentração de tubulina) até alcançar um platô (ALBERTS et al., 2002). A família das tubulinas compreende três tipos de polipeptídeos evolutivamente relacionados:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  tubulina. Os heterodímeros formados por  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina são os principais componentes dos microtúbulos. Em contraste, a  $\gamma$  tubulina parece estar restrita aos pólos mitóticos (JULIAN et al., 1993).

Movimentos intracelulares periódicos observados nas células eucarióticas são gerados por proteínas motoras que se ligam tanto aos filamentos de actina como aos microtúbulos, como as miosinas, que se deslocam ao longo dos filamentos de actina, as



cinesinas e as dineínas, que se movem em direção às extremidades dos microtúbulos (ALBERTS et al., 2002). Existem muitas situações nas quais os microtúbulos e os filamentos de actina atuam de modo coordenado. De acordo com IBÁÑEZ et al. (2003), a interação dos microtúbulos dos fusos mitóticos com filamentos de actina no córtex celular media a rotação do fuso e coordena a cariocinese e a citocinese.

Durante a maturação meiótica, em oócitos de mamíferos, ocorrem várias mudanças nucleares e citoplasmáticas, incluindo quebra da vesícula germinativa (GVBD), condensação dos cromossomos, extrusão de corpúsculo polar (CP) e formação do fuso meiótico. Essas mudanças estruturais estão associadas a alterações na organização de microtúbulos (MTs) e microfilamentos (MFs). A organização e desorganização desses componentes do citoesqueleto têm papel-chave na regulação da formação do fuso meiótico, alinhamento e segregação dos cromossomos, movimento do material nuclear de uma posição central para cortical e extrusão do 1º e 2º corpúsculos polares (LI et al., 2005). Tem sido demonstrado que a formação e as mudanças morfológicas dos fusos dependem da atividade de MTs, MFs e proteínas motoras associadas aos cromossomos e MTs (BARTON e GOLDSTEIN, 1996; BRUNET e VERNOS, 2001; WITTMANN et al., 2001).

A retomada da meiose, após a fecundação ou a ativação artificial de oócitos em metáfase II, é caracterizada pela segregação cromossômica para os pólos do fuso, alongamento e rotação do fuso meiótico e extrusão do segundo corpúsculo polar contendo metade dos cromossomos do oócito (IBÁÑEZ et al., 2003).

Microtúbulos não são observados nos estádios GV e GVBD (KIM et al., 1996; LI et al., 2005). Após a quebra da vesícula germinativa, a cromatina condensa-se e poucos MTs aparecem próximos à cromatina, tornando-se facilmente visíveis de metáfase I até os estádios tardios da meiose. Os fusos passam de uma forma arredondada, nos estádios MI e MII, para uma forma cilíndrica nos estádios AI e AII, formando uma estrutura semelhante a um longo triângulo nos estádios TI e TII (LI et al., 2005). Em bovinos, os MTs e MFs muitas vezes são extrusos junto com o 1º e o 2º CP, sendo que esses ficam completamente rodeados por MTs, ao contrário de outras

espécies, onde MTs não são observados no 1º CP (KIM et al., 1996; LEE et al., 2000; WANG et al., 2000; SUN et al., 2001).

Na célula mitótica ou meiótica, o MPF pode induzir a reorganização de MTs em intérfase para uma configuração de metáfase (VERDE et al., 1992). A atividade do MPF diminui entre MI e MII, mas os microtúbulos mantêm a configuração de metáfase durante esse período. MÉO et al. (2002) observaram que 98,7% dos oócitos maduros não submetidos ao estímulo de ativação permanecem em configuração de metáfase II (características nucleares e de microtúbulos) até às 42 horas de maturação. VERLHAC et al. (1994) demonstraram, em murinos, que as mudanças na organização de MTs e na condensação de cromatina durante a meiose estão mais correlacionadas com a atividade da MAPK do que com o MPF, sendo que em suínos resultados semelhantes foram encontrados (KIM et al., 1996).

Já a saída da metáfase exige a destruição do MPF, pela degradação da subunidade regulatória ciclina B (WINSTON et al., 1995). Em camundongos, a destruição da ciclina requer a presença de um fuso intacto (KUBIAK et al., 1993). Além do fuso intacto, deve ocorrer um pulso de cálcio para que ocorra a progressão dos oócitos parados em MII para a fase de intérfase.

Os microtúbulos, juntamente com microfilamentos e uma série de proteínas associadas estão envolvidos no processo de citocinese, sendo que os microtúbulos estimulam a formação de um anel contrátil durante a anáfase, sendo necessários à completa separação das células-filhas (LARKIN e DANILCHIK, 1999).

Os microtúbulos são estruturas altamente lábeis e, com isso, o fuso mitótico é alvo de uma variedade de drogas anti-mitóticas específicas, que interferem com a troca de subunidades de tubulina entre os microtúbulos e o “pool” de tubulina livre. Uma dessas drogas é a colchicina, sendo que cada molécula de colchicina liga-se firmemente a uma molécula de tubulina, impedindo sua polimerização. A exposição de uma célula em divisão à colchicina ou à demecolcina, que é uma droga semelhante, causa o desaparecimento rápido do fuso mitótico, indicando que o equilíbrio químico é mantido através da troca constante de subunidades entre os microtúbulos do fuso e o “pool” de tubulina livre (ALBERTS et al., 2002).

MOSES et al. (1995) mostraram que oócitos de camundongos tratados com colcemida apresentaram cromossomos agrupados sem microtúbulos com 30 minutos de exposição à droga, sendo que ao serem submetidos a meio livre de droga por aproximadamente 3 horas, os microtúbulos foram novamente observados.

Segundo GASPARRINI et al. (2003), o mecanismo de posicionamento e rotação do fuso é pouco compreendido em oócitos de mamíferos, mas sabe-se que envolve interações entre microtúbulos e microfilamentos corticais.

### **2.3. Clonagem de animais**

Em animais, a clonagem pode ser definida como a produção de indivíduos geneticamente idênticos (HEYMAN e RENARD, 1996). SPEEMANN (1938) propôs inicialmente o conceito da “equivalência nuclear”, ou seja, que o núcleo de células diferenciadas teria a capacidade de iniciar e sustentar o desenvolvimento embrionário normalmente. Contudo, somente em 1952, BRIGGS e KING demonstraram, em suas pesquisas com anfíbios (*Rana pipiens*), que o isolamento do núcleo de células embrionárias em blástula e sua introdução no interior de citoplasma de um zigoto previamente enucleado seria capaz de proporcionar o desenvolvimento embrionário normal até o estágio larval de girino.

O primeiro relato de mamíferos nascidos a partir de embriões reconstituídos foi descrito em camundongos por ILLMENSEE e HOPE (1981). A técnica envolvia o isolamento do núcleo de células da massa celular interna (MCI) e sua introdução diretamente no citoplasma de zigotos, posteriormente enucleados. McGRATH e SOLTER (1983) são considerados os pioneiros na reconstrução de embriões mamíferos utilizando um método invasivo, denominado transferência nuclear (TN). Essa técnica envolve microcirurgia e fusão celular e não requer o isolamento e a injeção do núcleo no interior do citoplasma. O primeiro relato de um mamífero nascido a partir dessa técnica foi descrito por WILLADSEN (1986), em ovinos. Desde então, a transferência nuclear vem sendo empregada com êxito em diversas outras espécies a partir de células embrionárias, como em bovinos (PRATHER et al., 1987), caprinos (YONG e

YUQIANG, 1998), coelhos (STICE e ROBL, 1988), suínos (PRATHER et al., 1989), camundongos (CHEONG et al., 1983) e macacos (MENG et al., 1997).

O desenvolvimento da técnica de transferência nuclear em mamíferos a partir de células embrionárias e o crescente interesse da indústria e centros de pesquisa na multiplicação de animais geneticamente idênticos fez com que novos estudos fossem realizados utilizando-se células em estágio de diferenciação mais avançado. A possibilidade de estabelecimento e manutenção de culturas de células a serem utilizadas como fonte doadora de núcleo foi fundamental para o desenvolvimento da técnica descrita por WILMUT et al. (1997), que resultou no nascimento da ovelha “Dolly”, o primeiro clone produzido a partir de células somáticas diferenciadas obtidas de um animal adulto.

A produção de clones por transferência nuclear de células somáticas e fetais tem sido empregada com sucesso em várias espécies: ovinos, bovinos, suínos, camundongos, coelhos, ratos, muares, equinos, gatos (FULKA et al., 2004) e, mais recentemente, cães (LEE et al., 2005). Porém, a eficiência da clonagem ainda é extremamente baixa, pois é um processo que envolve complexa combinação de fatores tanto biológicos como técnicos que interagem entre si, muitos dos quais ainda não são compreendidos (WELLS, 1999).

A transferência nuclear de células somáticas é uma técnica com várias aplicações para seleção animal, produção de animais transgênicos, conservação de espécies ameaçadas de extinção e pesquisas relacionadas à diferenciação celular e interação núcleo-citoplasmática. Essa técnica é influenciada por vários fatores, como fonte da célula doadora de núcleo e estágio de diferenciação, número de repiques das células durante o cultivo celular, estágio do ciclo celular, idade oocitária, processo de ativação, enucleação e cultivo utilizados (LIU et al., 2000).

As taxas de sucesso da transferência nuclear, avaliadas pelo número de animais nascidos por embrião micromanipulado, permanecem na ordem de 1% a 2%, na maioria das espécies domésticas (RUSSEL et al., 2005).

O dano inicial causado ao embrião durante a manipulação e o cultivo, aparentemente, levam a perdas durante o primeiro trimestre de gestação, quando

aproximadamente 50% das gestações oriundas de TN são perdidas em bovinos, ovinos e caprinos (CIBELLI et al., 1998; KATO et al., 1998; WELLS et al., 1999). Esforços para aumentar a eficiência dessa técnica têm se concentrado em melhorar dois constituintes básicos da TN, o oócito receptor e a célula doadora de núcleo (RUSSEL et al., 2005).

Nos procedimentos padrões de MIV, em bovinos, uma população heterogênea de oócitos é obtida de folículos de vários tamanhos recuperados a partir de ovários de distintos animais oriundos de abatedouro em diferentes fases do ciclo estral, o que resulta em variáveis níveis de interação e competência oocitária. Isso apresenta reflexo direto na maturação das organelas citoplasmáticas e quantidade de RNAs e proteínas específicas maternas, necessárias ao desenvolvimento embrionário inicial (HAGEMANN, 1999).

Tem-se verificado diferenças quanto às taxas de desenvolvimento dos embriões reconstituídos de acordo com a célula doadora de núcleo utilizada (KATO et al., 2000), indicando que algumas células são mais facilmente reprogramadas do que outras. Nesse sentido, a escolha do tipo celular a ser usado para a reconstituição pode contribuir para maior eficiência da clonagem.

A remoção dos cromossomos do oócito para a produção do citoplasto receptor, denominado de “enucleação oocitária”, é um processo essencial na transferência nuclear para a manutenção da ploidia correta. No procedimento convencional, a enucleação é realizada por microcirurgia utilizando-se oócitos em estágio de metáfase II, por meio da aspiração, para o interior de uma micropipeta, do primeiro corpúsculo polar (CP) e de parte adjacente do citoplasma do oócito. Em bovinos e suínos, devido à maior opacidade apresentada pelos oócitos em decorrência da maior taxa de lipídeos, torna-se difícil a visualização dos cromossomos metafásicos utilizando-se microscopia de campo claro. Desse modo, a maioria dos protocolos utiliza o corante específico de DNA, Hoechst 33342, o qual sob excitação à luz ultra-violeta (UV), permite a visualização da cromatina e a confirmação da enucleação. No entanto, a exposição à UV pode provocar danos aos oócitos e à membrana plasmática (SMITH, 1993).

Após a enucleação dos oócitos e introdução da célula doadora de núcleo no espaço perivitelínico, para que o núcleo seja introduzido no interior do citoplasma do

oócito enucleado, é necessário que ocorra a fusão entre ambas as membranas citoplasmáticas. Vários métodos podem ser usados para que ocorra essa fusão celular. A eletrofusão tem sido o método mais eficiente e utilizado para proceder a fusão entre o citoplasma do oócito enucleado e a célula embrionária ou diferenciada, em diversas espécies, como camundongos (TSUNODA et al., 1987; KONO e TSUNODA, 1988), coelhos (OZIL e MODLINSKI, 1986; STICE e ROBL, 1988), ovinos (WILLADSEN, 1986; SMITH e WILMUT, 1989), bovinos (PRATHER et al., 1987; BONDIOLI et al., 1990) e suínos (PRATHER et al., 1989b).

O estágio do ciclo celular tanto da célula doadora de núcleo como do citoplasma receptor, no momento da reconstituição embrionária, constitui um fator importante que pode influenciar o desenvolvimento após a transferência nuclear. As pesquisas iniciais com relação ao ciclo celular, na TN utilizando-se blastômeros, concentraram-se em questões sobre o estágio do ciclo do núcleo doador (fase  $G_1$ , S ou  $G_2$ ) para manter a ploidia correta e evitar danos ao DNA nuclear. CAMPBELL et al. (1996) sugeriram o uso de citoplastos pré-ativados (enucleados em telófase II e, portanto, com baixos níveis de MPF) como “receptores universais” para a transferência nuclear, aptos a sustentar o desenvolvimento do núcleo em qualquer fase do ciclo celular. Isso foi benéfico no caso de uso de células embrionárias, uma vez que cerca de 80% dos blastômeros encontram-se em fase S. A utilização de oócitos em metáfase II, com alta atividade de MPF, resultaria apenas em desenvolvimento quando células doadoras de núcleo em fase  $G_1$  do ciclo celular fossem usadas. A manutenção de células doadoras em cultivo celular abriu a possibilidade do uso de células que estão em estágio de quiescência ( $G_0$ ). As culturas de células podem ser artificialmente mantidas em fase  $G_0$  através da privação de fatores de crescimento. O método mais comumente usado para sincronização das células nesse estágio ocorre pela redução do soro do meio de cultivo (para 0,1 a 0,5%) ou remoção de outros fatores de crescimento (CAMPBELL et al., 1999). Entretanto, células somáticas sem privação de soro já foram utilizadas com êxito para produção de clones (CIBELLI et al., 1998).

Os mecanismos envolvidos na reprogramação do núcleo ainda são pouco conhecidos, sendo que vários estudos têm sido realizados nesse sentido, para melhor

compreender os eventos da reprogramação nuclear, que incluem modificações estruturais do núcleo, como trocas das proteínas das lâminas nucleares (PRATHER et al., 1989a, 1991), alterações na morfologia nucleolar (CZOŁOWSKA et al., 1984; KANKA et al., 1999) e trocas das variantes de histona H1 (BORDIGNON et al., 1999). Mais recentemente, tem-se pesquisado as modificações epigenéticas que ocorrem no genoma para apropriada ativação de genes durante o desenvolvimento (KONO, 1997, 1998; RENARD, 1998; RIDEOUT et al., 2001), como alterações nos padrões de metilação (REIK et al., 2001) e expressão (De SOUSA et al., 1999; DANIELS et al., 2000; WRENZYCKI et al., 2001) e modificação de genes “imprinted” (LATHAM, 1999).

Em bovinos, a eficiência da clonagem tem-se mostrado bastante variável. O desenvolvimento dos embriões reconstituídos com células somáticas que atingem o estágio de mórula e blastocisto tem variado desde taxas inferiores a 5% até maiores que 65% (WESTHUSIN et al., 2001). A clonagem em bovinos também tem provocado alta frequência de mortalidade embrionária inicial (HILL et al., 2000a) e fetal (PEURA et al., 1999; HEYMAN et al., 2002). A alta taxa de mortalidade embrionária durante o início da gestação tem sido relacionada à má formação da placenta e ao retardo no desenvolvimento do corioalantóide, levando a falhas no desenvolvimento normal dos placentônios (HILL et al., 2000b, SMITH et al., 2000a; De SOUSA et al., 2001).

Problemas relacionados à gestação, como hidroalantóide, aumento do cordão umbilical, edema das membranas placentárias e presença de menor número de placentônios, porém de maior tamanho, também são relatados (KRUIP e DAAS, 1997; HILL et al., 1999, 2000b; WELLS et al., 1999). Ainda, aumento do peso corporal do recém-nascido e alta mortalidade neonatal são comuns em bezerros clonados (WILSON et al., 1995; GARTNER et al., 1998; HILL et al., 1999), num fenômeno denominado “Síndrome da Cria Gigante” (LOS – “Large Offspring Syndrome”). Uma vez que a LOS também ocorre a partir de embriões fertilizados *in vitro*, ainda não é claro se a clonagem por si só seria uma causa primária dessa síndrome, podendo-se atribuir esses problemas aos sistemas de cultivo (YONG et al., 1998).

Apesar dos recentes avanços verificados nos últimos anos nas pesquisas com TN, ainda se faz necessário melhorar a eficiência das atuais técnicas empregadas na clonagem a fim de torná-las viáveis.

#### **2.4 Novas técnicas empregadas na clonagem de animais**

A técnica de micromanipulação empregada na transferência nuclear (TN) foi originalmente introduzida por WILLADSEN et al. (1986) para clonagem de células embrionárias e, em seguida, foi adaptada para células somáticas por WILMUT et al. (1997). Essa técnica é atualmente utilizada em quase todos os laboratórios, apesar das desvantagens conhecidas, incluindo equipamento oneroso, tempo de trabalho consumido, necessidade de pessoas altamente qualificadas e hábeis e, geralmente, baixa eficiência do procedimento (VAJTA et al., 2003).

Como é difícil a visualização da cromatina sob microscopia de campo claro em várias espécies de animais domésticos, como bovinos e suínos, oócitos em MII são muitas vezes enucleados “às cegas”, guiando-se apenas pelo 1º corpúsculo polar (CP) e as taxas de enucleação não são muito altas devido ao deslocamento da cromatina presente no citoplasma do oócito em relação ao 1º CP (BORDIGNON e SMITH, 1998; MOHAMED NOUR et al., 1999). Uma escolha é a enucleação de oócitos sob irradiação de luz UV através de prévia coloração com corantes específicos de DNA. Porém, embora esse método aumente a acurácia da enucleação, é prejudicial ao desenvolvimento embrionário (PRATHER et al., 1987; SMITH, 1993).

A primeira tentativa publicada de expansão das fronteiras convencionais e exclusão da micromanipulação na transferência nuclear foi a técnica relatada por FULKA e MOOR (1993): a enucleação química oocitária não-invasiva, com uso do etoposídeo, um inibidor de síntese protéica. As principais vantagens dessa técnica são a simplicidade e a falta de necessidade de equipamentos caros. Esses autores ainda relatam que o cultivo dos citoplastos em meio livre dos agentes químicos após seu tratamento permite que os níveis de MPF sejam rapidamente restaurados. Além de



murinos (FULKA e MOOR, 1993; ELSHEIKH et al., 1997; KARNIKOVA et al., 1998), essa técnica também foi descrita em suínos (SAVARD et al., 2004).

A centrifugação de zigotos de animais domésticos é normalmente utilizada para visualização de pronúcleos para facilitar a microinjeção de DNA na produção de animais transgênicos (TATHAM et al., 1995). A centrifugação causa a estratificação de organelas em vários graus dentro do citoplasma, de acordo com sua densidade (CRAN et al., 1987). TATHAM et al. (1995) desenvolveram a técnica de enucleação oocitária através de centrifugação submetendo oócitos bovinos a um gradiente descontínuo de Percoll, técnica também relatada por WAGONER et al. (1996), que observaram diminuição na taxa de clivagem, e por SAVARD et al. (2004), em suínos.

A enucleação em telófase tem sido considerada um método eficiente no preparo de citoplastos para a TN em bovinos (BORDIGNON e SMITH, 1998; MOHAMED NOUR et al., 1999), ovinos (PEURA et al., 2003) e camundongos (MUNSIE et al., 2002). A técnica de enucleação em telófase foi descrita inicialmente por BORDIGNON e SMITH (1998), em bovinos, e consiste na ativação partenogenética de oócitos maduros e remoção do 2º CP com o citoplasma ao redor, por meio de micromanipulação. A vantagem dessa técnica é que limitado volume de citoplasma é removido, mas o protocolo de ativação leva à queda dos níveis de MPF, tido como importante no processo de remodelamento do núcleo transferido.

A técnica de enucleação não-invasiva induzida quimicamente em oócitos pré-ativados, visando a saída de todo o material nuclear juntamente com o 2º CP, foi relatada em murinos (BAGUISI e OVERSTROM, 2000; GASPARRINI et al., 2003; IBÁÑEZ et al., 2003), coelhos (YIN et al., 2002a), caprinos (IBÁÑEZ et al., 2002), ovinos (GASPARRINI et al., 2002) e bovinos (RUSSEL et al., 2005). Essa técnica é baseada na ativação partenogenética de oócitos, seguida pela exposição a agentes desestruturadores de microtúbulos possibilitando a extrusão de toda a cromatina junto com o 2º CP. Quando comparamos a enucleação não-invasiva de oócitos em MI ou MII há uma marcante diferença. Enquanto no primeiro caso, o CP juntamente com todo o conteúdo nuclear é completamente liberado do oócito, no segundo caso o contato entre

o 2º CP e o citoplasma do oócito persiste, fornecendo desta forma uma enucleação somente temporária (FULKA et al., 2004).

A enucleação também pode ser realizada, em várias espécies domésticas, com o microscópio Pol-Scope, com luz polarizada, no qual fusos altamente birrefringentes podem ser observados, possibilitando eficiência de enucleação de 100%. A principal desvantagem do método é o alto valor do equipamento (LIU et al., 2000). Ainda, recentemente, autores relatam a possibilidade de enucleação de oócitos bovinos através de irradiação com raio X (KIM et al., 2004).

DOMINKO et al. (2000) mostraram a possibilidade do uso de fluorocromos alternativos ao Hoechst 33342, com maior comprimento de onda, para coloração de cromatina (Sybr 14) e microtúbulos (tubulina conjugada à rodamina) em oócitos bovinos.

Oócitos livres de zona pelúcida (“zona free”) têm sido empregados com sucesso no procedimento de transferência nuclear com uso de micromanipulação (BOOTH et al., 2001a,b; OBACK et al., 2003) ou através da técnica de clonagem manual ou “Handmade Cloning” (VAJTA et al., 2001, 2003). No procedimento relatado por OBACK et al. (2003), oócitos livres de zona pelúcida são primeiramente corados com Hoechst 33342 para visualização da cromatina e em seguida têm seu material nuclear removido com uma pipeta de enucleação. Esses citoplastos são então agregados às células somáticas e submetidos à fusão.

A técnica de clonagem manual ou “Handmade Cloning” baseia-se na bissecção de oócitos livres de zona pelúcida, que pode ser randômica ou orientada, com o uso de microlâminas sob um estereomicroscópio. Em seguida, os demi-oócitos são corados com Hoechst 33342 e expostos à irradiação UV, separando-se citoplastos de carioplastos. Essa técnica simplificada já foi descrita em suínos (KRAGH et al., 2004, 2005) e bovinos (VAJTA et al., 2001, 2003, 2004; BHOJWANI et al., 2005; PEDERSEN et al., 2005), inclusive permitindo o nascimento de bezerros sadios (TECIRLIOGLU et al., 2003; BARTELS et al., 2004).

A enucleação manual de oócitos livres de zona pelúcida também pode ser orientada pelo CP, mas apresenta algumas desvantagens. A separação entre o CP e o

oócito que ocorre após a digestão com pronase pode ser prevenida pela pré-incubação do oócito em fitohemaglutinina, mas é, até certo ponto, inconsistente. Ainda, um efeito desfavorável é que a fitohemaglutinina dificulta a completa digestão da zona pelúcida pela pronase (VAJTA et al., 2004). Outra possibilidade de orientação é através da enucleação assistida quimicamente, técnica baseada no tratamento de oócitos com agentes desorganizadores de microtúbulos, induzindo a extrusão de um “cone” visível na superfície do oócito, contendo toda a cromatina condensada. A remoção desse “cone” e citoplasma ao redor pode resultar em enucleação confiável (YIN et al., 2002b; KAWAKAMI et al., 2003; LI et al., 2004; VAJTA et al., 2004).

## **2.5. Eucleação química**

Em camundongos e ratos, os cromossomos em MII são visíveis em microscópio óptico como uma área translúcida (FULKA et al., 2004), porém esse não é o caso de outras espécies de mamíferos como suínos, bovinos, ovinos e caprinos, nas quais a visualização dos cromossomos dificilmente é possível sem a coloração do DNA (YIN et al., 2002b).

O procedimento de enucleação na TN tradicional é invasivo e envolve a coloração do núcleo com Hoechst 33342 com aspiração do 1º CP e placa metafásica adjacente utilizando-se irradiação UV para que a enucleação seja confirmada. A irradiação UV causa significativa diminuição no desenvolvimento de embriões ao estágio de blastocisto, principalmente devido à indução de alterações de membrana e componentes intracelulares de oócitos bovinos (SMITH, 1993) e de defeitos causados na cromatina (DOMINKO et al., 2000). Ainda, o fluorocromo Hoechst 33342, que possui um comprimento de onda curto (excitação 350nm), transfere grande quantidade de energia ao material biológico sob excitação (DOMINKO et al., 2000).

Considerando-se que o oócito é enucleado durante o processo de TN, os defeitos de cromatina induzidos pela irradiação UV podem não ter papel na alteração do potencial de desenvolvimento de embriões oriundos desta técnica. Porém, o DNA mitocondrial permanece nos citoplastos enucleados podendo ser afetado durante a

exposição à UV, alterando, dessa forma, o metabolismo do embrião reconstituído (RUSSEL et al., 2005).

A injúria causada ao oócito é agravada pela remoção concomitante de volume considerável de citoplasma ao redor da placa metafásica do oócito receptor durante o procedimento de enucleação, sendo que este citoplasto contém RNAm, proteínas e precursores moleculares essenciais ao desenvolvimento embrionário inicial até a ativação do genoma embrionário (BARNES e EYESTONE, 1990). Ainda, o procedimento de enucleação é um evento crucial para a clonagem devido à eliminação de qualquer contribuição genética do citoplasma receptor. Rotineiramente, a enucleação pode resultar em 30% de DNA residual nos citoplastos (LI et al., 2004).

Em bovinos, há relatos de eficiência de enucleação variando entre 50 e 82% (KONO et al., 1994; ROBL et al., 1989; WESTHUSIN et al., 1991). O 1º CP está freqüentemente deslocado da posição esperada em relação à metáfase e, sendo assim, a remoção de citoplasma próximo ao CP sem coloração não é um método seguro para remoção da cromatina (DOMINKO et al., 2000). MOHAMED NOUR e TAKAHASHI (1999) mostraram que a cromatina em MII pode ser encontrada em diferentes localizações em relação ao CP após 18 a 20 horas de maturação. Encontraram 40,7% do material nuclear na posição 1 (imediatamente adjacente ao CP), 28,8% na posição 2 (próximo ao CP mas não em íntima associação), 15,3% na posição 3 (meio do citoplasma) e 15,3% na posição 4 (oposto ao CP).

Além da necessidade de coloração dos oócitos com corantes específicos de DNA, que provocam injúrias tanto na membrana quanto nos componentes intracelulares oocitários (SMITH, 1993), a remoção de grande quantidade de citoplasma do oócito receptor no procedimento de TN tradicional pode ocasionar diminuição na taxa de desenvolvimento de blastocistos (GREISING et al., 1994; ZAKHARTCHENKO et al., 1997). WESTHUSIN et al. (1996) embora não tenham encontrado diferenças significativas na produção de blastocistos quando reduziram 5% ou 50% do volume oocitário, observaram que o número de células dos blastocistos resultantes foi significativamente menor no segundo caso.

A enucleação química é um procedimento não-invasivo muito atrativo por causar mínima diminuição do volume citoplasmático e do conteúdo protéico e molecular (RUSSEL et al., 2005). Várias substâncias têm sido utilizadas para indução de enucleação química, incluindo o etoposídeo (FULKA e MOOR, 1993; ELSHEIKH et al., 1997, 1998; KARNIKOVA et al., 1998), a colchicina e a demecolcina (BAGUISI e OVERSTRÖM, 2000; GASPARRINI et al., 2003; IBÁNEZ et al., 2003).

Oócitos murinos em metáfase I, cultivados em meio suplementado com etoposídeo inicialmente, e cicloheximide durante a transição anáfase/telófase, resultaram em 96% de eficácia na enucleação segundo FULKA e MOOR (1993). Porém, na mesma espécie, desenvolvimento limitado tem sido observado com o uso de citoplastos provenientes dessa técnica (GASPARRINI et al., 2003).

SAVARD et al. (2004) relataram duas técnicas alternativas de enucleação em oócitos suínos, utilizando a centrifugação através de um gradiente descontínuo de Percoll (TATHAM et al., 2005) e a enucleação química total baseada na técnica descrita por FULKA e MOOR (1993), alcançando taxas de enucleação de 74% e 47%, respectivamente, para cada técnica.

De acordo com VAJTA et al. (2004), o tratamento de oócitos bovinos em MII com demecolcina, seguido pela digestão enzimática com pronase, induz a formação de protrusões em 94% dos oócitos. Essa alta incidência é atribuída ao efeito conjunto da demecolcina e da pronase, já que nenhum desses agentes sozinhos foi capaz de induzir a formação de protrusões em mais de 60-70% dos oócitos tratados. LI et al. (2004) relatam alta taxa de enucleação (96%) de oócitos bovinos tratados com colcemida, assegurando dessa forma, a remoção de todo o material nuclear materno, eliminando a possibilidade de permanência de material genético residual no citoplasto. Também é relatado que a adição de 0,05M de sacarose provoca aumento do espaço perivitelínico em oócitos bovinos, facilitando a visualização da protrusão induzida pelo tratamento com demecolcina (KAWAKAMI et al., 2003).

A enucleação assistida quimicamente pela demecolcina tem resultado em não comprometimento do desenvolvimento *in vivo* no procedimento de TN, possibilitando o

nascimento de clones de coelhos (YIN et al., 2002a), suínos (YIN et al., 2002b) e murinos (GASPARRINI et al., 2003).

## 2.6. Demecolcina

A demecolcina ou desacetil-N-metil-colchicina é um derivado da colchicina, cujo princípio ativo é extraído do cólchico, semente madura dessecada do *Colchicum autumnale*, planta que cresce principalmente no Sudeste da Europa, utilizada no tratamento de linfoma de Hodgkin (MINGOIA, 1967).

A demecolcina e a vimblastina são integrantes de um grande grupo de drogas anti-mitóticas que inibem a organização de microtúbulos. Muitas dessas drogas são utilizadas com sucesso em procedimentos quimioterápicos (HARI et al., 2003). Esses inibidores de microtúbulos causam parada do ciclo celular no estágio de metáfase em vários tipos celulares em processo de mitose (MOSES et al., 1995). A demecolcina liga-se a dímeros de tubulina, evitando a polimerização de microtúbulos, resultando na perda da dinâmica de fuso dos microtúbulos (RUSSEL et al., 2005).

A demecolcina tem mostrado ser eficiente na indução de enucleação oocitária completa em murinos (BAGUISI e OVERSTROM, 2000; GASPARRINI et al., 2003; IBÁÑEZ et al., 2003), caprinos (IBÁÑEZ et al., 2002) e bovinos (RUSSEL et al., 2005) após ativação partenogenética dos oócitos. Nas três espécies testadas, a eficiência da enucleação tem-se mostrado dependente do início da administração da droga em relação ao momento da ativação partenogenética oocitária.

Esse agente também tem se revelado eficaz na indução de enucleação assistida quimicamente, na qual oócitos em metáfase II são submetidos ao tratamento com demecolcina por uma a duas horas, observando-se a formação de uma protrusão na região cortical oocitária próxima ao 1º CP contendo todo o material nuclear condensado, permitindo, dessa forma, a retirada desse material através de micromanipulação, sem a necessidade de coloração do mesmo. Essa técnica foi relatada em coelhos (YIN et al., 2002a), suínos (YIN et al., 2002b), murinos (GASPARRINI et al., 2003) e bovinos, em que o uso desse agente apenas foi

empregado na concentração 0,2µg/mL (LI et al., 2004). Em bovinos, a demecolcina também foi utilizada na técnica de clonagem manual ou “Handmade Cloning” na concentração 0,5µg/mL (VAJTA et al., 2004).

IBÁÑEZ et al. (2003) realizaram um estudo sobre as manifestações da demecolcina na dinâmica de rotação do fuso meiótico, em oócitos murinos, e observaram efeitos evidentes da droga 15 minutos após o início do tratamento. Em bovinos, embora esse agente já seja utilizado em procedimentos de enucleação oocitária, não há relatos de estudos dos efeitos dessa droga.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Gerais**

- Comparar efeitos da demecolcina em oócitos bovinos submetidos ao tratamento em metáfase I e metáfase II e verificar a capacidade de desenvolvimento embrionário após transferência nuclear (TN) empregando-se a técnica de enucleação assistida quimicamente pela demecolcina.

#### **3.2. Específicos**

- Verificar a menor concentração eficiente da demecolcina no processo de enucleação e formação de protrusão em oócitos bovinos;
- Avaliar taxas de enucleação e formação de protrusão em oócitos expostos à demecolcina em metáfase I e metáfase II, respectivamente;
- Estabelecer a dinâmica nuclear e de microtúbulos em oócitos bovinos submetidos ao tratamento com demecolcina em metáfase I e metáfase II;
- Avaliar a influência da exposição de oócitos bovinos à demecolcina na maturação nuclear e citoplasmática, utilizando-se a distribuição de grânulos corticais como indício de maturação citoplasmática;
- Verificar o desenvolvimento embrionário, pela avaliação das taxas de clivagem e produção de blastocistos, subsequente à transferência nuclear (TN) com a técnica de enucleação assistida pela demecolcina.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção e maturação de oócitos

Oócitos bovinos foram obtidos a partir de aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouro, que foram colhidos e transportados em recipiente isotérmico contendo solução salina estéril e mantidos à temperatura de 30-35°C. No laboratório, os ovários foram lavados com solução salina estéril aquecida e os folículos ovarianos, medindo entre 3 e 8mm de diâmetro, foram aspirados utilizando-se agulha 18-G acoplada a seringa descartável de 20mL e o fluido aspirado transferido para um tubo de poliestireno de 50mL. Ao término da aspiração, o sedimento formado foi distribuído em placas de poliestireno de 60mm de diâmetro, procedendo-se a seleção dos oócitos em microscópio estereoscópico.

Foram selecionados oócitos com aspecto homogêneo de citoplasma e compactação das células do *cumulus*, com pelo menos três a quatro camadas de células de revestimento. Os oócitos selecionados foram lavados duas vezes em meio TCM-199 contendo tampão Hepes, suplementado com 10% de SFB, 0,20mM de piruvato e 83,4µg/mL de amicacina (meio de lavagem) e uma vez em meio de maturação (TCM-199 com tampão bicarbonato suplementado com 10% de SFB, 1,0µg/mL de FSH, 50µg/mL de hCG, 1,0µg/mL de estradiol, 0,20mM de piruvato e 83,4µg/mL de amicacina). Em seguida, os oócitos foram transferidos para placas de quatro poços Nunc<sup>®</sup> com 400µL de meio de maturação (40-50 oócitos/poço) ou para microgotas de 100µL de meio (20-25 oócitos/gota), de acordo com o experimento, cobertas por óleo mineral. O cultivo dos oócitos para maturação *in vitro* foi realizado em estufa a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

## **4.2. Experimento I: Influência da concentração de demecolcina na formação de protrusão na região cortical ou enucleação total de oócitos bovinos.**

Uma curva de concentração da droga (demecolcina) foi estabelecida, sendo avaliados oócitos que receberam tratamento com 12 horas (MI) e com 21 horas (MII) de maturação.

### **4.2.1 - Oócitos em metáfase I (MI) submetidos ao tratamento com demecolcina.**

Oócitos com 12 horas de maturação (MI) receberam tratamento com demecolcina nas seguintes concentrações: 0 (controle); 0,05µg/mL; 0,2µg/mL e 0,4µg/mL. A droga foi diluída diretamente no meio de maturação presente nos poços da placa Nunc<sup>®</sup>, onde os oócitos estavam sendo maturados. Após 24 horas de maturação (12 horas em meio suplementado com demecolcina), os oócitos foram desnudados incubando-se os complexos-*cumulus*-oócitos em hialuronidase (2mg/mL) a 38,5°C por 5 minutos procedendo-se, em seguida, pipetagem durante 3 a 5 minutos. Os oócitos desnudos foram então corados com 10µg/mL de Hoechst 33342 diluído em meio TCM 199 Hepes durante 10 minutos. Após a coloração, os oócitos foram observados em microscópio de epifluorescência (330-385nm) e avaliados quanto à formação de protrusão na região cortical ou enucleação oocitária total. Em cada repetição foram utilizados 30 a 50 oócitos por tratamento e foram realizadas 10 repetições. Após o estabelecimento da melhor concentração da droga utilizada, essa foi adotada nos experimentos seguintes.

### **4.2.2 - Oócitos em metáfase II (MII) submetidos ao tratamento com demecolcina.**

Oócitos com 21 horas de maturação (MII) foram desnudados com hialuronidase da mesma maneira citada anteriormente e, em seguida, receberam o tratamento com demecolcina durante 2 horas nas seguintes concentrações: 0 (controle); 0,05µg/mL; 0,2µg/mL e 0,4µg/mL. Posteriormente, os oócitos foram corados com 10µg/mL de

Hoechst 33342 diluído em meio TCM 199 Hepes durante 10 minutos. Após a coloração, os oócitos foram observados em microscópio de epifluorescência e avaliados quanto à formação de protrusão na região cortical do oócito, contendo toda cromatina condensada. Em cada repetição foram utilizados 30 a 50 oócitos por tratamento e foram realizadas 10 repetições. Após o estabelecimento da melhor concentração da droga, essa foi adotada nos experimentos seguintes.

### **4.3. Experimento II: Avaliação da dinâmica nuclear e de microtúbulos de oócitos bovinos submetidos ao tratamento com demecolcina.**

#### **4.3.1 - Oócitos em MI submetidos ao tratamento com demecolcina.**

Oócitos com 12 horas de maturação foram expostos à demecolcina ( $0,05\mu\text{g/mL}$ ) de acordo com o experimento I (item 4.2.1), sendo fixados e avaliados quanto aos diferentes estádios nucleares e de fuso meiótico (microtúbulos), nos seguintes momentos: 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 4 e 12 horas após o início do tratamento com a demecolcina. Em cada repetição foram utilizados 40 a 60 oócitos por tratamento e foram realizadas 3 repetições. O método de fixação e coloração utilizado está descrito adiante.

#### **4.3.2 - Oócitos em MII submetidos ao tratamento com demecolcina.**

Oócitos com 21 horas de maturação recebendo tratamento com demecolcina ( $0,05\mu\text{g/mL}$ ) por 2 horas, foram fixados e avaliados quanto aos diferentes estádios nucleares e de fuso meiótico (microtúbulos) nos seguintes momentos: 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 4 e 8 horas após o início do tratamento com demecolcina. Ressalta-se que, após 2 horas de exposição à droga, os oócitos foram submetidos ao meio de maturação sem suplementação com demecolcina, até serem completadas 8 horas após o início do tratamento. Em cada repetição foram utilizados 40 a 60 oócitos por tratamento e foram

realizadas 3 repetições. O protocolo de fixação e coloração utilizado está descrito a seguir.

**4.3.3** - Protocolo para avaliação de imunofluorescência direta de tubulina e cromatina.

Utilizou-se a técnica descrita por LIU et al. (1998). Os oócitos oriundos dos momentos mencionados anteriormente permaneceram 30 minutos a 38°C em tampão estabilizador de microtúbulo (0,1M Pipes, pH 6,9; 5mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 2,5mM EGTA), com 2% de formaldeído, 0,1% de Triton X-100, 1µM de taxol, 0,01% de aprotinina, 1mM de ditiotreitol e 50% de óxido deutério. Os oócitos foram incubados durante a noite a 4°C em meio de lavagem e incubação – MLI (PBS com 0,02% de NaN<sub>3</sub>; 0,01% de Triton X-100; 0,2% de leite em pó desnatado; 2% de BSA e 0,1M de glicina). Posteriormente, os oócitos foram incubados em MLI contendo anticorpo monoclonal de camundongo anti-α-tubulina (1:50; Sigma) conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) a 38°C por 2 horas. Após serem lavados em MLI, os oócitos foram então corados com 10µg/mL de Hoechst 33342 em MLI por 10 minutos, montados em lâmina com 90% de glicerol em PBS e avaliados sob fluorescência em 330-385 e 420-490nm. Avaliou-se o comportamento dos fusos meióticos e dos cromossomos.

#### **4.4. Experimento III: Efeitos da demecolcina sobre a cinética da maturação nuclear e migração dos grânulos corticais em oócitos bovinos.**

**4.4.1** - Oócitos em MI submetidos ao tratamento com demecolcina.

Seguindo os mesmos padrões de maturação e exposição à demecolcina do item 4.2.1, oócitos desse grupo foram avaliados quanto à maturação nuclear e distribuição de grânulos corticais (GC em “clusters”, GC em transição, GC na periferia, excitose) em quatro momentos: 0; 2; 4 e 12 horas após início do tratamento. Oócitos destinados à avaliação da maturação nuclear foram fixados por, aproximadamente, 1 hora em

solução de paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente, corados, no momento da avaliação, com Hoechst 33342 (10µg/mL) por 10 minutos e avaliados quanto ao estágio de progressão nuclear. Em cada repetição foram utilizados 30 a 50 oócitos por tratamento e foram realizadas 3 repetições. O protocolo de fixação e coloração de grânulos corticais está descrito adiante.

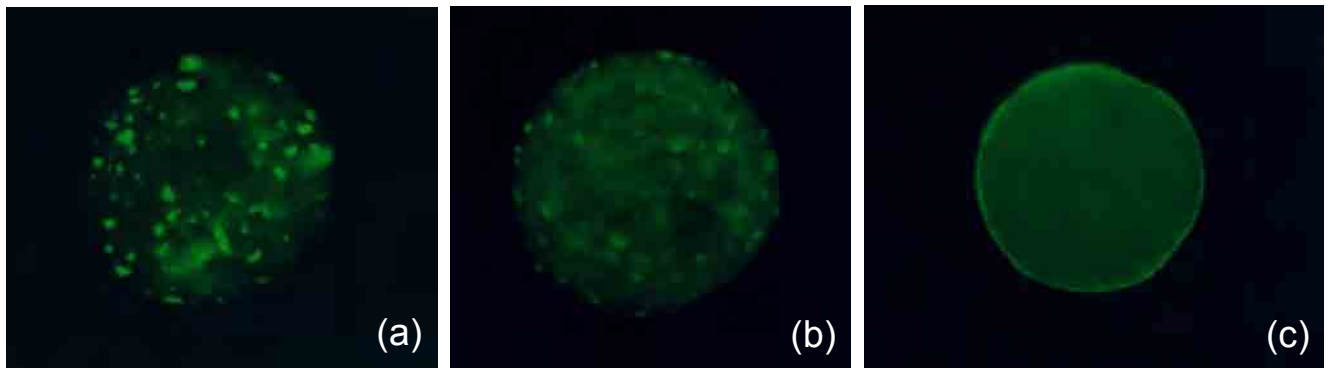
#### **4.4.2 - Oócitos em MII submetidos ao tratamento com demecolcina.**

A mesma metodologia de maturação e exposição à demecolcina do item 4.2.2 foi utilizada. Oócitos obtidos antes (GV) e após a maturação por 21 horas (0 h) e 2 e 4 h após a exposição à demecolcina por 2 horas foram avaliados quanto a maturação nuclear e a distribuição dos grânulos corticais (GC em “clusters”, GC em transição, GC na periferia, exocitose). Oócitos destinados à avaliação da maturação nuclear foram fixados por aproximadamente 1 hora em solução de paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente, corados, no momento da avaliação, com Hoechst 33342 (10µg/mL) por 10 minutos e avaliados quanto ao estágio de progressão nuclear. Em cada repetição foram utilizados 30 a 50 oócitos por tratamento e foram realizadas 3 repetições. O protocolo de fixação e coloração de grânulos corticais está descrito abaixo.

#### **4.4.3 - Protocolo de coloração de cromatina e grânulos corticais.**

Utilizou-se a metodologia descrita por CHERR et al. (1988) com algumas modificações. Oócitos coletados nos momentos citados anteriormente tiveram, inicialmente, a zona pelúcida removida com a incubação em pronase a 0,5% em PBS, por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, os oócitos foram fixados em 3% de formaldeído em PBS por 30 minutos, à temperatura ambiente e incubados a 4°C durante a noite em solução de bloqueio – SB (PBS com 1mg/mL de BSA, 100mM de glicina e 0,2% de azida de sódio). Para a permeabilização, os oócitos foram tratados por 5 minutos a 38°C em SB com a adição de 0,1% de Triton X-100. Os oócitos foram

então incubados com 10µg/mL de *Lens culinaris* aglutinina conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC-LCA; esta lecitina liga-se especificamente à  $\alpha$ -D-manose presente nos grânulos corticais) em SB por 15 minutos. Em seguida, os oócitos foram lavados em SB três vezes (5 minutos cada vez), montados em lâmina com 90% de glicerol em PBS e visualizados em microscópio de epifluorescência. Foi avaliada a distribuição de grânulos corticais no interior dos oócitos de acordo com a Figura 1



**Figura 1.** Fotomicrografias de grânulos corticais (GC) em oócitos bovinos durante o processo de MIV. (a) GC dispostos em “clusters” no interior do oócito (oócito imaturo); (b) GC em transição, dispostos tanto no centro quanto na periferia do oócito (transição imaturo/maturo); (c) GC dispostos na periferia do oócito, logo abaixo da membrana vitelínica (oócito maturo). Os oócitos foram corados com lecitina (específica a  $\alpha$ -D-manose) conjugada a FITC e avaliados sob microscopia de epifluorescência.

#### **4.5. Experimento IV: Eficiência da técnica de enucleação assistida pela demecolcina e desenvolvimento embrionário após o procedimento de transferência nuclear.**

##### **4.5.1 – Células doadoras de núcleo**

Foram utilizados fibroblastos como doadores de núcleo, obtidos de fragmentos de pele da região da orelha de fêmea bovina adulta *Bos taurus indicus*, animal da raça Nelore POI. Após o estabelecimento de linha celular primária a partir dos fragmentos de

pele, repique (3 a 9 repiques) e congelação, as células foram descongeladas de acordo com a necessidade.

#### **4.5.2 – Obtenção de oócitos e maturação *in vitro***

Metodologia descrita no item 4.1.

#### **4.5.3 – Sincronização das células doadoras de núcleo**

Linhas celulares de fibroblastos, após sofrerem repique, foram distribuídas em placas de poliestireno de 35mm de diâmetro contendo DMEM suplementado com 10% de SFB. O meio foi renovado a cada 48 horas e quando as células apresentaram confluência, removeu-se o meio de cultivo, procedendo-se, em seguida, duas lavagens em PBS livre de cálcio e magnésio para completa remoção do soro. Adicionou-se 2mL de DMEM suplementado com 0,5% de SFB a cada placa para indução das células à quiescência e sincronização do ciclo celular em estágio  $G_0$ - $G_1$  (CAMPBELL et al., 1996), compatíveis com citoplasto enucleado em metáfase II, para manutenção de correta ploidia dos embriões reconstituídos. O meio foi renovado a cada 48 horas, sendo utilizadas as linhas celulares de fibroblastos após 3 a 5 dias de privação de soro como fontes doadoras de núcleo.

#### **4.5.4 – Confecção das pipetas de apreensão e injeção**

A pipeta de apreensão, utilizada para correto posicionamento do oócito nos procedimentos de enucleação e transferência nuclear foi produzida por estiramento manual de um tubo capilar de borossilicato de vidro (D.E.: 1,0mm, D.I.: 0,75mm, 10cm de comprimento, Sutter Instrument Company). Após o estiramento, o capilar foi posicionado em microforja para realização de seu corte e acabamento, de tal forma que a extremidade da pipeta de apreensão apresentasse abertura em torno de 25 a 30 $\mu$ m.

Em seguida, foram realizadas duas curvaturas opostas na pipeta, de maneira a permitir seu correto posicionamento na câmara de micromanipulação.

Quanto à pipeta de injeção, um tubo capilar do mesmo material (D.E.: 1,0mm, D.I.: 0,75mm, 10cm de comprimento, Sutter Instrument Company) foi estirado com um estirador de pipeta automático (P-2000 Micropipette Puler, Sutter Instrument Company), efetuando-se, em seguida, seu corte em microforja, objetivando-se um diâmetro interno de 22,5 a 25 $\mu$ m para enucleação oocitária e transferência nuclear. Um bisel de aproximadamente 55° foi feito com auxílio de um esmirilhador (EG-40 Micropipette Grinder, Narishige Co. Ltd.).

#### 4.5.5 – Eucleação oocitária

Após 19 horas de maturação os oócitos foram desnudados, incubando-se os complexos-*cumulus*-oócitos em hialuronidase (2mg/mL) durante, aproximadamente, 5 minutos. Após a remoção das células do *cumulus*, os oócitos foram submetidos ao tratamento com demecolcina (0,05 $\mu$ g/mL) por 2 horas, completando-se 21 horas de maturação, quando os oócitos foram removidos do meio suplementado com a droga, lavados três vezes em meio de lavagem (TCM-199 com tampão HEPES) e selecionados quanto à presença de 1° CP ou protrusão na região cortical oocitária em microscópio estereoscópico. Os oócitos foram, então, transferidos para uma gota de micromanipulação contendo meio HSOF com 10% de SFB suplementado com 7,5 $\mu$ g/mL de citocalasina B. Procedeu-se a enucleação apenas em oócitos que apresentaram a formação de protrusão. O procedimento foi realizado em microscópio óptico invertido (Olympus IX-70) em placa aquecedora à temperatura de 37°C, removendo-se o primeiro corpúsculo polar e a protrusão formada na região cortical oocitária com uma pipeta de diâmetro interno entre 22,5 e 25 $\mu$ m. Nesse momento, parte dos citoplastos foram corados com Hoechst 33342 por 10 minutos (10 $\mu$ g/mL) e avaliados quanto à eficiência da enucleação. Os oócitos restantes, não submetidos à coloração, foram lavados em meio TCM-199 com tampão HEPES e incubados em meio



HSOF com 10% de SFB a temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, até o início da reconstituição dos oócitos por transferência nuclear.

#### 4.5.6 – Reconstituição por transferência nuclear e eletrofusão

Como fonte doadora de núcleo, foram utilizadas culturas de células com privação de soro entre 3 e 5 dias. Após o processo de tripsinização (tripsina 0,05% com 1% de soro de galinha, suplementada com 1mM de EDTA), neutralização (DMEM com 10% de SFB) e centrifugação (210g durante 10 minutos), os fibroblastos foram ressuspendidos em meio HSOF sem SFB, sendo, em seguida, transferidos para a câmara de micromanipulação, onde permaneceram até o início da transferência nuclear.

Trinta minutos antes da microcirurgia, os oócitos enucleados foram incubados em meio HSOF suplementado com 10% de SFB e 7,5µg/mL de citocalasina B. A reconstituição foi realizada segundo KATO et al. (1998), com algumas modificações. A câmara de micromanipulação para transferência nuclear continha duas gotas distintas recobertas com óleo mineral: uma contendo meio HSOF com 10% de SFB e 7,5µg/mL de citocalasina B para a realização da transferência nuclear e outra, contendo meio HSOF sem soro, onde foram depositadas as células doadoras de núcleo. Foram selecionados fibroblastos de menor diâmetro, apresentando contorno regular da membrana plasmática. Cada fibroblasto foi aspirado individualmente para o interior da pipeta de injeção na gota contendo as células e em seguida, na gota contendo oócitos enucleados, efetuou-se a transferência nuclear, inserindo-se o fibroblasto no espaço perivitelínico do oócito (em contato com a membrana citoplasmática) utilizando-se o mesmo orifício da zona pelúcida realizado anteriormente, no processo de enucleação.

Após a transferência nuclear, os oócitos foram removidos da câmara de micromanipulação, lavados em meio HSOF com 10% de SFB, onde permaneceram em estufa até o início da eletrofusão.

A união da célula doadora de núcleo com o citoplasma receptor foi realizada por eletrofusão em solução de manitol (0,28M de manitol, 0,05mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,1mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,05mM de HEPES ácido e 3mg/mL de BSA), segundo WELLS et al. (1998,

1999). Para a fusão celular, cada conjunto oócito-fibroblasto foi posicionado e corretamente alinhado na câmara de eletrofusão, sendo submetido a dois pulsos elétricos de corrente direta de 40V por 20 $\mu$ seg cada, com auxílio do aparelho Electrocell Manipulator 2001 (BTX, San Diego, CA). Após a eletrofusão, os oócitos foram lavados e incubados a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar em meio HSOF com 10% de SFB até a avaliação da taxa de fusão celular, realizada 30 a 60 minutos após a fusão.

#### **4.5.7 – Ativação dos oócitos**

Os oócitos foram ativados artificialmente, com a incubação em meio TCM-199 com tampão HEPES e 10% de SFB suplementado com 5 $\mu$ M de ionomicina por 5 minutos, em temperatura ambiente, sendo em seguida lavados várias vezes em meio TCM-199 com tampão HEPES. Posteriormente, os oócitos foram incubados em meio de desenvolvimento SOF suplementado com 2mM de 6-DMAP, em estufa a 38,5°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas.

#### **4.5.8 – Cultivo e avaliação do desenvolvimento embrionário**

Ao término do tratamento de ativação, os oócitos foram lavados várias vezes em meio de desenvolvimento SOF, sendo o cultivo de desenvolvimento realizado nas mesmas condições, em meio SOF suplementado com 2,5% de SFB e 5mg/mL de BSA em co-cultivo com células da granulosa. Os oócitos foram mantidos em estufa a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, sendo cultivados entre 10 e 20 oócitos por gota de 100 $\mu$ L de meio de desenvolvimento, em placas de poliestireno de 60mm recobertas com óleo mineral. O meio de desenvolvimento foi parcialmente renovado no segundo, quarto e sexto dias de desenvolvimento embrionário, removendo-se 50% do meio pré-existente na gota de desenvolvimento e repondo-se volume igual de meio recém-preparado. Os embriões foram avaliados quanto à taxa de clivagem, às 48 horas, e taxa de desenvolvimento a blastocisto, no 7º dia de desenvolvimento.

#### **4.6. Análise estatística**

Os resultados dos experimentos I, II e III foram submetidos à ANOVA. As médias, no experimento I, foram comparadas pelo teste Duncan e, nos experimentos II e III, pelo teste de Tukey, com o procedimento GLM do SAS System (Versão 8.2). Foi utilizado nível de significância de 5% em todos os experimentos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Experimento I: Influência da concentração de demecolcina na formação de protrusão na região cortical ou enucleação total de oócitos bovinos.

#### 5.1.1 - Oócitos em metáfase I (MI) submetidos ao tratamento com demecolcina.

Oócitos em metáfase I (com 12 horas de maturação), expostos à demecolcina por um período de 12 horas, foram avaliados quanto à formação de protrusão (PR) na região cortical, com todo o material nuclear condensado (incompleta extrusão do 1º CP) e enucleação total (EN), de acordo com a Figura 2. Os resultados estão expressos na Tabela 1 e Figura 3.

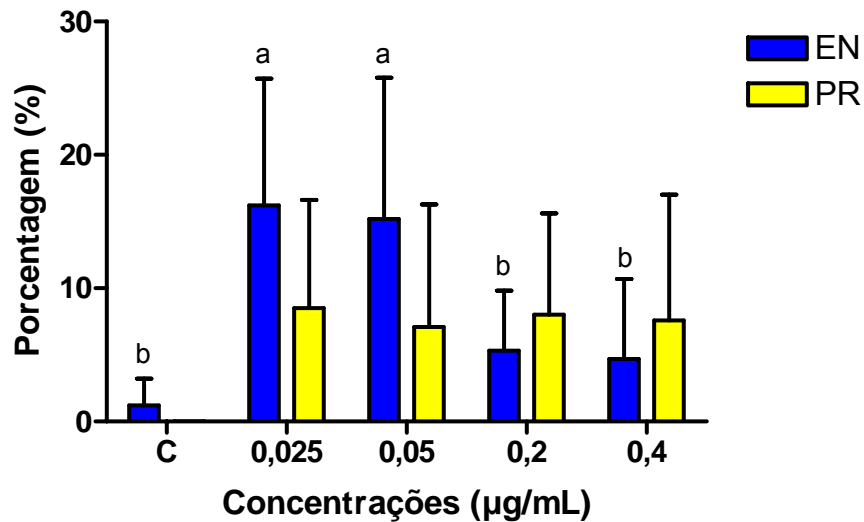


**Figura 2.** Fotomicrografias de oócitos bovinos tratados com demecolcina em MI e avaliados após 24 horas de maturação, por coloração com Hoechst 33342. (a) Oócito com formação de protrusão na região cortical (indicada pela seta), contendo todo o material nuclear; (b, c) Oócitos com enucleação total, com toda a cromatina condensada junto ao 1º CP (setas indicam o 1º CP contendo todo o material nuclear).

**Tabela 1.** Enucleação (EN) e formação de protrusão (PR) em oócitos bovinos com 12 horas de maturação (MI) expostos a diferentes concentrações (0; 0,025; 0,05; 0,2 e 0,4 $\mu$ g/mL) de demecolcina por 12 horas.

Concentração ( $\mu$ g/mL)	Número de Oócitos Tratados	Oócitos (médias % $\pm$ dp)	
		EN	PR
0 (Controle)	354	5 (1,2 $\pm$ 2,0) <sup>b</sup>	0 (0 $\pm$ 0) <sup>b</sup>
0,025	398	60 (16,2 $\pm$ 9,5) <sup>a</sup>	32 (8,5 $\pm$ 8,1) <sup>a</sup>
0,05	392	57 (15,2 $\pm$ 10,6) <sup>a</sup>	22 (7,1 $\pm$ 9,2) <sup>a</sup>
0,2	398	21 (5,3 $\pm$ 4,5) <sup>b</sup>	28 (8,0 $\pm$ 7,6) <sup>a</sup>
0,4	385	16 (4,7 $\pm$ 6,0) <sup>b</sup>	21 (7,6 $\pm$ 9,4) <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Representação gráfica da porcentagem de oócitos com protrusão (PR) e enucleação completa (EN) após o tratamento de oócitos bovinos em MI com diferentes concentrações de demecolcina por um período de 12 h, completando-se 24 h de maturação. EN – oócitos enucleados; PR – oócitos com protrusão.

Quanto à taxa de enucleação, as concentrações 0,025 e 0,05µg/mL foram superiores ( $p < 0,05$ ) aos grupos: controle, 0,2 e 0,4µg/mL, mas não diferiram entre si sendo, portanto, eleitas as melhores concentrações para indução de enucleação. Quanto à formação de protrusão, as concentrações foram semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ).

Técnicas semelhantes, mas com uso de diferentes tratamentos químicos foram descritas em murinos (FULKA e MOOR, 1993; ELSHEIKH et al., 1997) e suínos (SAVARD et al., 2004). Esses autores relataram o tratamento de oócitos em MI com etoposídeo (50µg/mL), um inibidor de topoisomerase II, por um período de 2 horas com o intuito de se prevenir a separação entre os cromossomos, seguido pelo tratamento com cicloheximide (50µg/mL), inibidor de síntese protéica, por um período de 12 horas, facilitando-se, dessa forma, a expulsão de todo o material nuclear junto ao 1º CP pela redução dos níveis de MPF causada pelo cicloheximide. Em murinos, eficiente enucleação oocitária foi obtida, alcançando-se aproximadamente 96% de eficácia (FULKA e MOOR, 1993). Já em suínos, uma média de  $39,4 \pm 7,5\%$  de enucleação foi obtida utilizando-se o mesmo protocolo.

Como em trabalhos prévios com bovinos (PERECIN et al., 2004), não obtivemos sucesso com o uso de etoposídeo ou outros agentes químicos, como a camptotecina e a doxorubicina, associados ao cicloheximide, alcançando índices máximos de enucleação de 11,9% dos oócitos e ainda, levando-se em consideração vários relatos sobre a necessidade de alta atividade de MPF para correto remodelamento do núcleo (SZOLLOSI et al. 1988; TANI et al., 2001), optamos pelo tratamento único com demecolcina. De acordo com KAWAKAMI et al. (2003), a diminuição da atividade do MPF nos oócitos pode diminuir a viabilidade desses quando submetidos à TN.

Os resultados obtidos quanto à enucleação (16,2 e 15,2% para as concentrações 0,025 e 0,05µg/mL de demecolcina, respectivamente) estão de acordo com FULKA e MOOR (1993), que avaliaram os efeitos do etoposídeo e cicloheximide em oócitos murinos. Esses autores também observaram que, em oócitos bovinos, tais tratamentos promovem baixa enucleação. Até o momento, tem-se obtido resultados satisfatórios com a técnica de enucleação não-invasiva de oócitos em MI somente em murinos

(FULKA et al., 2004), porém, ELSHEIKH et al. (1997, 1998) verificaram desenvolvimento embrionário limitado, apesar da alta eficácia do procedimento de enucleação.

Observamos ainda, em alguns oócitos, a formação de protrusão contendo toda a cromatina na região cortical, que se deve provavelmente à incompleta extrusão do corpúsculo polar, possivelmente causada pela alta atividade do MPF ou falta de microtúbulos (ação da demecolcina) que são importantes no processo de extrusão do 1º CP. Os microtúbulos, juntamente com microfilamentos e uma série de proteínas associadas, estão envolvidos no processo de citocinese, estimulando a formação de anel contrátil durante a anáfase, sendo necessários à completa separação das células-filhas (LARKIN e DANILCHIK, 1999). Ainda, de acordo com LI et al. (2005) a organização e desorganização do citoesqueleto, em particular microtúbulos e microfilamentos, têm papel fundamental na formação do fuso meiótico, alinhamento e segregação dos cromossomos, movimento do material nuclear de uma posição central para a região cortical e extrusão de 1º e 2º CP.

A produção de citoplasto receptor é uma etapa crucial na transferência nuclear, pois participa na correta reprogramação do núcleo transferido, assegurando o desenvolvimento de embriões reconstituídos. Por essa razão, a simplificação dessa etapa é de grande interesse da comunidade científica (FULKA et al., 2004). Apesar da grande quantidade de estudos em murinos, ao nosso conhecimento, não há relatos adicionais do uso dessa técnica (enucleação química de oócitos em MI) em bovinos e, assim, razões para as diferenças espécie-específicas, ainda não são compreendidas.

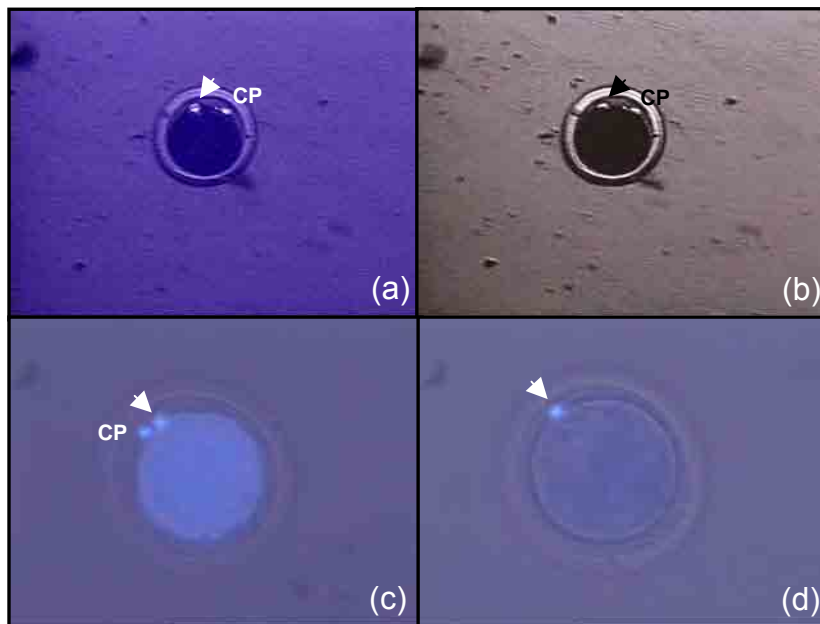
#### **5.1.2 - Oócitos em metáfase II (MII) submetidos ao tratamento com demecolcina.**

Oócitos com 21 horas de maturação (MII), expostos a diferentes concentrações de demecolcina por 2 horas, foram analisados quanto à formação de protrusão na região cortical oocitária. A protrusão, geralmente, foi localizada próxima ao 1º CP (Figura 4), embora algumas vezes tenha sido encontrada distante do mesmo. Os resultados estão expressos na Tabela 2 e Figura 5.

**Tabela 2.** Valores referentes à formação de protrusão (PR) (média  $\pm$  dp) em oócitos bovinos em MII (21 horas dematuração) expostos a diferentes concentrações de demecolcina (0; 0,025; 0,05; 0,2 e 0,4  $\mu\text{g/mL}$ ) por 2 horas.

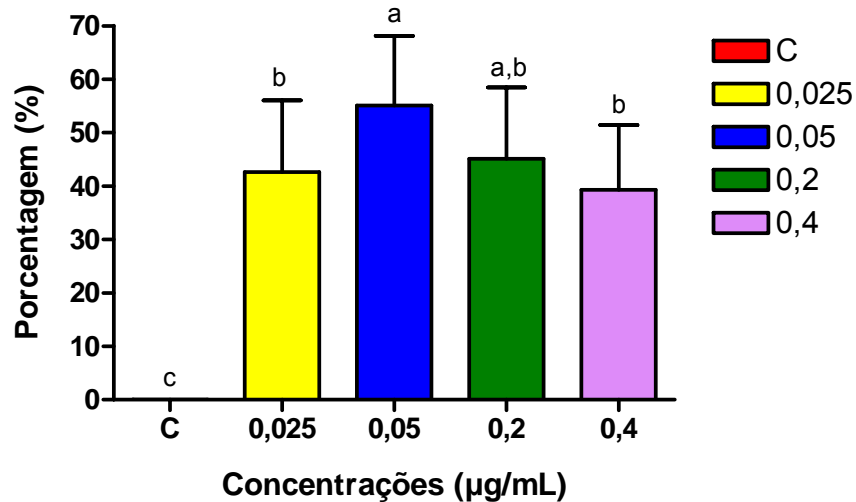
Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Número de Oócitos Tratados	PR (médias % $\pm$ dp)
0 (Controle)	354	0 (0 $\pm$ 0) <sup>c</sup>
0,025	369	159 (42,6 $\pm$ 13,4) <sup>b</sup>
0,05	388	211 (55,1 $\pm$ 13,0) <sup>a</sup>
0,2	367	162 (45,1 $\pm$ 13,4) <sup>a,b</sup>
0,4	363	141 (39,3 $\pm$ 12,1) <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Fotomicrografias de oócitos bovinos em metáfase II (MII) expostos à demecolcina por 2 horas, com formação de protrusão na região cortical (indicada pela seta): presença do 1º CP e protrusão observados com (a) ou sem (b) fluorescência. Protrusão bem próxima ao CP (c); formação de protrusão em oócitos sem CP (d).





**Figura 5.** Representação gráfica da porcentagem de oócitos bovinos com protrusão (PR) expostos em MII a diferentes concentrações de demecolcina por um período de 2 h.

Quanto à formação de protrusão na região cortical oocitária, a concentração 0,05µg/mL foi superior ( $p < 0,05$ ) às concentrações 0,025 e 0,4µg/mL e semelhante ( $p > 0,05$ ) à concentração 0,2µg/mL. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as concentrações 0,025; 0,2 e 0,4µg/mL. A concentração escolhida para os experimentos seguintes foi 0,05µg/mL, em função de ter sido a menor concentração que proporcionou a maior eficácia na produção de oócitos com protrusões ( $55,1 \pm 13,0\%$  dos oócitos tratados).

Os resultados obtidos nesse experimento foram inferiores àqueles observados por outros autores, que relataram formação de protrusão em aproximadamente 70% dos oócitos tratados, em suínos (YIN et al., 2002b, KAWAKAMI et al., 2003) e bovinos (LI et al., 2004). Tal fato pode ter sido decorrente da utilização de oócitos sem prévia seleção da presença de CP, procedimento realizado pelos autores citados e, portanto, sem características nucleares indicativas de maturação. Na tentativa de se otimizar o procedimento, eliminando o tempo gasto com a seleção de corpúsculos polares, optamos pela não seleção desses e, assim, tínhamos uma população heterogênea de

oócitos, sendo que, parte desses, provavelmente, não apresentava maturação adequada, podendo não ter respondido à ação da demecolcina.

A demecolcina liga-se com alta afinidade a dímeros de tubulina impedindo a polimerização de microtúbulos, resultando na perda da dinâmica de fuso em células mitóticas e meióticas (IBANEZ et al., 2003). Embora não esteja claro o motivo pelo qual oócitos tratados com desorganizadores de microtúbulos formem protrusões na membrana plasmática, KAWAKAMI et al. (2003) propuseram o seguinte mecanismo: o fuso meiótico de oócitos expostos à demecolcina torna-se desorganizado e os cromossomos ficam condensados, localizados próximos à membrana plasmática e ancorados em local rico em actina, fornecendo uma estrutura rígida ao córtex oocitário, formando uma protrusão nessa região.

Uma observação interessante neste experimento, foi a alta eficácia da concentração 0,05µg/mL de demecolcina na indução de formação de protrusão na região cortical oocitária, em função de concentrações bem mais altas terem sido utilizadas em trabalhos anteriores. LI et al. (2004) utilizaram, em oócitos bovinos, a concentração 0,2µg/mL, mas a maioria dos trabalhos relata o uso de concentração igual ou superior a 0,4µg/mL, tanto para indução de formação de protrusão no córtex oocitário (YIN et al., 2002b; KAWAKAMI et al., 2003; VAJTA et al., 2004) quanto para extrusão de toda a cromatina junto ao 2º CP após ativação partenogenética (BAGUISI e OVERSTROM, 2000; IBANEZ et al., 2002, 2003; GASPARRINI et al., 2002, 2003; YIN et al., 2002a; RUSSEL et al., 2005). Entretanto, verificamos que a concentração 0,05µg/mL não apenas foi a menor concentração efetiva, mas também, foi superior à concentração 0,4µg/mL, levando a maior número de oócitos com formação de protrusão, provavelmente por provocar menor alteração na organização geral do citoesqueleto, levando a menores danos ao oócito. Com isso, minimizamos as injúrias provocadas aos oócitos pela exposição à droga, o que provavelmente poderia se traduzir em maior desenvolvimento embrionário e fetal.

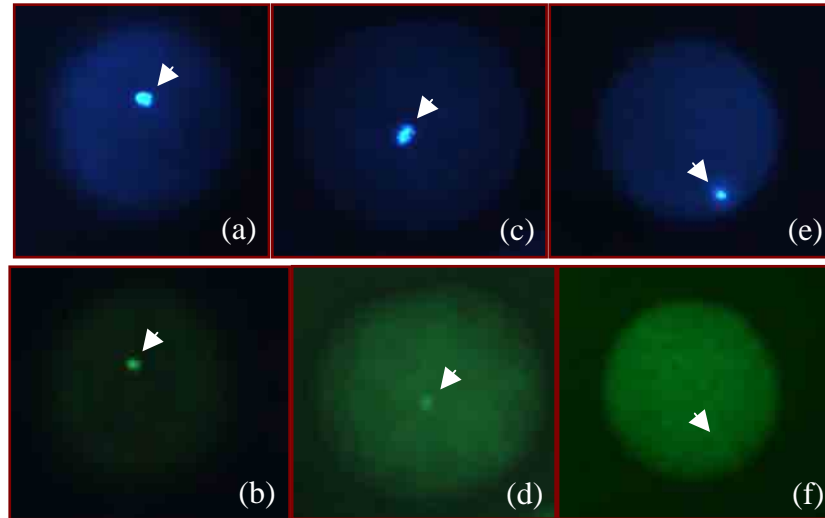
## **5.2. Experimento II: Avaliação da dinâmica nuclear e de microtúbulos de oócitos bovinos submetidos ao tratamento com demecolcina.**

### **5.2.1 - Oócitos em MI submetidos ao tratamento com demecolcina.**

Oócitos com 12 horas de maturação (MI) expostos à demecolcina foram avaliados quanto à dinâmica nuclear e de microtúbulos 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 4 e 12 horas após o início do tratamento. A Figura 6 demonstra características nucleares e dos fusos meióticos (microtúbulos) utilizadas para a classificação dos oócitos.

Os resultados obtidos quanto à avaliação microscópica de tubulina e cromatina em diferentes momentos após o início do tratamento estão descritos na Tabela 3 e esquematizados na Figura 7.

As categorias predominantes, nesse grupo, foram: 1DNA1MT (oócito em metáfase I com microtúbulos evidentes no mesmo local), 1DNAMTrd (oócito em metáfase I com redução de microtúbulos) e 1DNAsMT (oócito em MI sem a presença de microtúbulos). Ressalta-se que outras categorias avaliadas no grupo tratado com 21 horas de maturação, apesar de avaliadas no grupo 12 horas, não foram mencionadas pelo fato de suas médias serem próximas a zero.

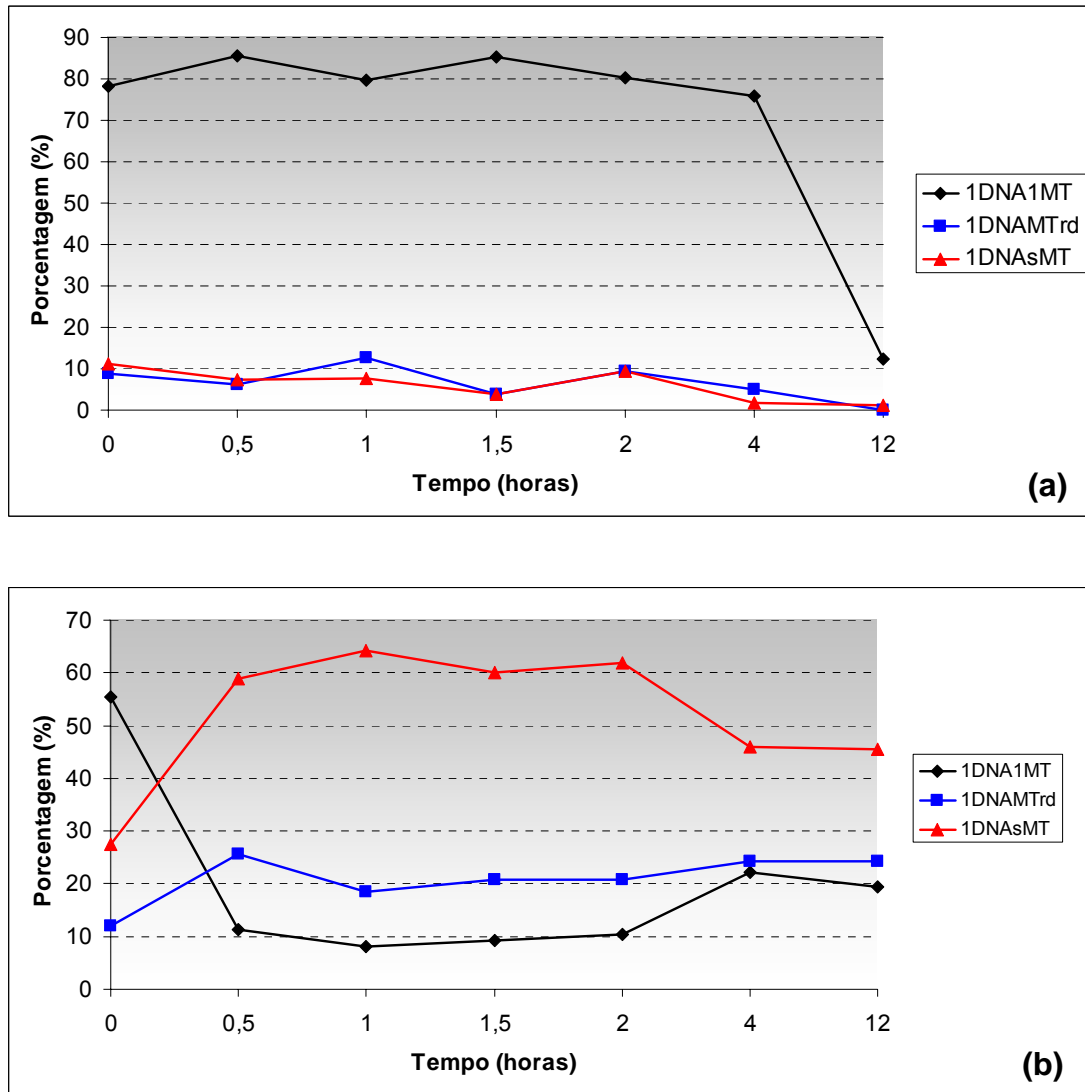


**Figura 6.** Fotomicrografias de oócitos bovinos tratados em metáfase I (MI) com demecolcina (avaliação da dinâmica nuclear e de microtúbulos). Categorias de oócitos encontradas: (a,b) 1DNA1MT – oócito em metáfase I com microtúbulos evidentes no mesmo local; (c,d) 1DNAMTrd – oócito em metáfase I com redução de microtúbulos; (e,f) 1DNAsMT – oócito em MI sem a presença de microtúbulos. (a,c,e) Oócitos corados com Hoechst 33342; (b,d,f) oócitos corados com anticorpo anti- $\alpha$  tubulina (1:50) conjugado a FITC, observados em microscópio de epifluorescência. As setas indicam material nuclear (azul) e microtúbulos (verde).

**Tabela 3.** Categorias de configuração nuclear e de microtúbulos verificadas após o tratamento de oócitos bovinos em MI (12 horas de maturação) com demecolcina por 0 a 12 horas. 1DNA1MT – oócito em metáfase I com microtúbulos evidentes no mesmo local; 1DNAMTrd – oócito em metáfase I com redução de microtúbulos; 1DNAsMT – oócito em MI sem a presença de microtúbulos.

<b>Momentos</b>	<b>1DNA1MT</b>	<b>1DNAsMT</b>
<b>0h</b>	55,34 ± 8,02 <sup>a</sup>	27,44 ± 16,00 <sup>b</sup>
<b>0,5h</b>	11,25 ± 4,46 <sup>b</sup>	58,86 ± 3,09 <sup>a,b</sup>
<b>1,0h</b>	8,0 ± 1,73 <sup>b</sup>	64,29 ± 10,95 <sup>a</sup>
<b>1,5h</b>	9,26 ± 4,15 <sup>b</sup>	60,09 ± 8,79 <sup>a</sup>
<b>2,0h</b>	10,38 ± 8,62 <sup>b</sup>	61,81 ± 11,73 <sup>a</sup>
<b>4,0h</b>	22,19 ± 16,08 <sup>b</sup>	45,97 ± 16,97 <sup>a,b</sup>
<b>12h</b>	19,34 ± 8,09 <sup>b</sup>	45,52 ± 5,74 <sup>a,b</sup>

<sup>a,b</sup> Valores com diferentes sobrescritos entre linhas diferem entre si ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7.** Representação gráfica da dinâmica nuclear e de microtúbulos de oócitos bovinos pertencentes (a) ao grupo controle (não tratado) e (b) ao grupo deme (expostos à demecolcina em MI por um período de 12 horas) avaliados a intervalos de 0,5 h nas primeiras 2 h de tratamento e após 4 e 12 h. 1DNA1MT – oócito em metáfase I com microtúbulos evidentes no mesmo local; 1DNAMTrd – oócito em metáfase I com redução de microtúbulos; 1DNAsMT – oócito em MI sem a presença de microtúbulos.

No início do tratamento, houve predomínio da categoria 1DNA1MT (55,3%) conforme esperado, pois nessa fase, possivelmente, o núcleo apresentou-se no estágio

MI verificando-se, portanto, um material nuclear (metáfase I), com microtúbulos ainda evidentes próximos ao núcleo. Com apenas 0,5 h de tratamento, houve diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) de oócitos pertencentes a essa categoria (11,2%), não ocorrendo diferença estatística ( $p > 0,05$ ) desse momento com relação aos outros avaliados até 12 horas de exposição à demecolcina. No grupo controle, não foi verificada diferença estatística entre os momentos avaliados até 4 h, com médias entre 75,7% e 85,5% dos oócitos com essa configuração, observando-se diminuição dessa categoria somente com 12 h (12,3%), ou seja, às 24 horas de maturação.

Embora não se tenha verificado alteração da categoria 1DNAMTrd ao longo do tempo de exposição à droga, com médias de 12,0% e 24,2% dos oócitos no início e final (12 horas) do tratamento, respectivamente, observou-se diferença ( $p < 0,05$ ) entre as médias dos grupos controle (6,5%) e tratado (20,9%).

Já a categoria 1DNAsMT sofreu grande variação em função do tempo, sendo que, no início, 27,4% dos oócitos apresentaram essa configuração e houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) com 1 h (64,3%), 1,5 h (60,0%) e 2 h (61,8%) de tratamento. Por outro lado, as médias voltaram a diminuir ( $p < 0,05$ ) com 4 h (46,0%) e 12 h (45,5%) de exposição à demecolcina. No grupo controle, verificamos com 1, 1,5, 2, 4 e 12 h, aproximadamente 7,6; 3,7; 9,3; 1,6 e 1,1% dos oócitos pertencentes a essa categoria, demonstrando grande diferença entre os grupos controle e tratado.

A cinética da maturação nuclear de oócitos bovinos tem sido estudada por vários autores (MOTLIK et al., 1978; HOMA, 1988; SUSS et al., 1988; SIRARD et al., 1989; DOMINKO e FIRST, 1997; LI et al., 2005). SIRARD et al. (1989) investigaram o tempo decorrido nos eventos meióticos em oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro*, observando que de 10,3 a 15,4 horas de MIV, os oócitos permaneceram em MI; 15,4 a 16,6 horas, em anáfase I (AI); 16,6 a 18 horas, em telófase I (TI) e de 18 a 24 horas, em MII. Portanto, a alta frequência observada de oócitos na categoria 1DNA1MT (50,34%) no início do tratamento (12 horas de maturação) justifica-se pelo fato da maioria dos mesmos estar em MI nesse momento (LI et al., 2005).

Observamos efeitos da droga já às 0,5 h de exposição, sendo que a manifestação da demecolcina traduziu-se em depleção dos microtúbulos, evidenciada

pelo aparecimento e predomínio da categoria 1DNAsMT. A diminuição e a menor densidade de microtúbulos relatada em trabalhos anteriores (GASPARRINI et al., 2003; IBANEZ et al., 2003) foi constatada em nosso trabalho (categoria 1DNAMTrd), porém, a média de oócitos que se encontravam nessa categoria não se alterou ao longo do experimento, provavelmente devido à rápida atuação da demecolcina, cujos efeitos foram verificados em oócitos murinos pelos autores citados anteriormente, com apenas 15 minutos de tratamento. Portanto, como o início de nossa avaliação procedeu-se com 0,5 h de exposição à droga, provavelmente, essa começou a agir imediatamente após ter sido adicionada ao meio contendo os oócitos, despolimerizando rapidamente os microtúbulos.

Praticamente, não foi observada a presença de oócitos em MII após 12 horas de tratamento (24 horas de maturação) e isso pode ser explicado pela ação anti-mitótica da droga, paralisando o núcleo em metáfase I. Conforme relatos de FULKA e MOOR (1993), ELSHEIKH et al. (1997) e SAVARD et al. (2004), esperávamos que toda a cromatina fosse extruída com o 1º CP mas, provavelmente, os altos níveis de MPF, evidenciado pela manutenção do núcleo em metáfase, não permitiram a retomada da meiose na maior parte dos oócitos tratados e com isso, nossos resultados quanto à enucleação não obtiveram sucesso.

Além de oócitos totalmente enucleados, observamos a formação de protrusão na região cortical de parte dos oócitos tratados, evidenciando incompleta extrusão do 1º CP, fato explicado por observações de IBÁÑEZ et al. (2003), que estudaram a cinética nuclear e do citoesqueleto de oócitos murinos expostos à demecolcina após ativação partenogênica, visando à extrusão do conteúdo nuclear com o 2º CP. Esses autores constataram que a completa extrusão do 2º CP foi prejudicada pela droga. Dessa maneira, além de oócitos totalmente enucleados e oócitos com material ainda presente no citoplasma, uma terceira categoria foi relatada: a presença de protrusões sobre fusos remanescentes contendo todo o material nuclear condensado, sendo que a rotação do fuso meiótico (que, normalmente, ocorre antes da extrusão do CP) não ocorreu na maioria dos oócitos tratados, evidenciado pela posição paralela do fuso remanescente em relação à membrana plasmática.

Várias citações sugerem que a interação entre os microtúbulos e os filamentos de actina do córtex celular, media a rotação do fuso e coordena a cariocinese e a citocinese (MARO et al., 1984; GARD et al., 1995). Com isso, a interrupção da estabilidade do fuso causada pela demecolcina deve também inibir sua rotação, explicando a falha na extrusão do CP. Estudos têm demonstrado em culturas de células de mamíferos, que os microtúbulos são essenciais ao processo de constricção que ocorre antes da clivagem (WHEATLEY et al., 1996). Várias proteínas necessárias à citocinese foram localizadas no fuso central e isso sugere que os microtúbulos podem servir como caminho ao longo do qual essas proteínas e outros componentes da célula se movem para a clivagem. Dessa forma, os resultados obtidos nesse experimento mostram que uma protuberância inicial foi formada, correspondendo à fase inicial de formação do CP, porém, mais tarde a constricção dessa protuberância foi prejudicada nos oócitos tratados com demecolcina.

Uma última consideração com relação a esse grupo é que, após 12 horas de tratamento, não houve nova polimerização dos microtúbulos, como mencionado por outros estudos envolvendo a demecolcina (SIRACUSA et al., 1980; RUSSEL et al., 2005). Isso provavelmente pode ser explicado pelo fato de que os oócitos não foram posteriormente cultivados em meio livre da droga para se verificar esse efeito ou, ainda, pelo extenso período de tratamento (12 horas).

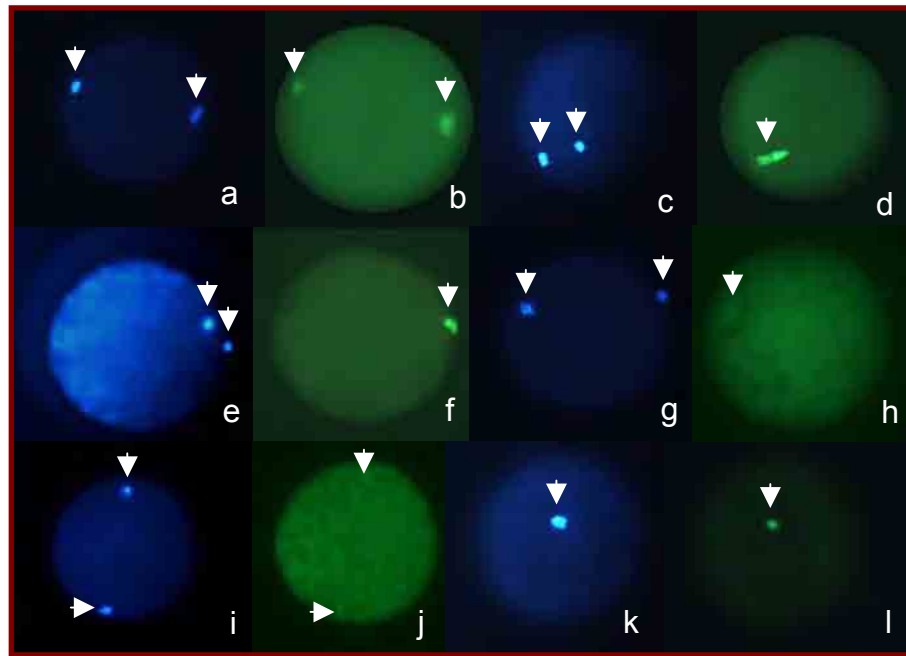
### **5.2.2 - Oócitos em MII submetidos ao tratamento com demecolcina.**

Oócitos com 21 horas de maturação (MII), expostos a 0,05µg/mL de demecolcina por 2 horas, foram avaliados quanto à dinâmica nuclear e de microtúbulos 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 4 e 8 horas após o início do tratamento. Características nucleares e de microtúbulos mostradas nas Figuras 8 e 9 foram utilizadas para a classificação dos oócitos. Os resultados estão esquematizados na Figura 10.

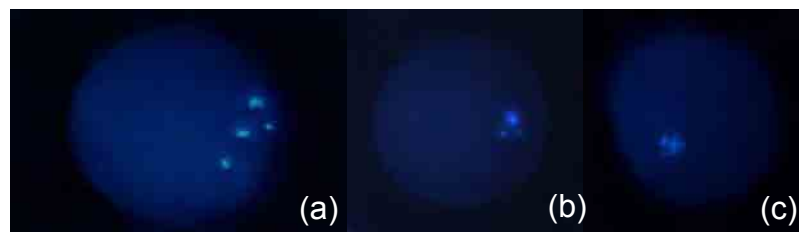
As categorias avaliadas nesse grupo foram: MII (oócito em metáfase II com microtúbulos evidentes tanto no citoplasma do oócito quanto no corpúsculo polar), AI/TI (transição anáfase/telófase I), 2DNA1MT (oócito em MII com microtúbulos evidentes em



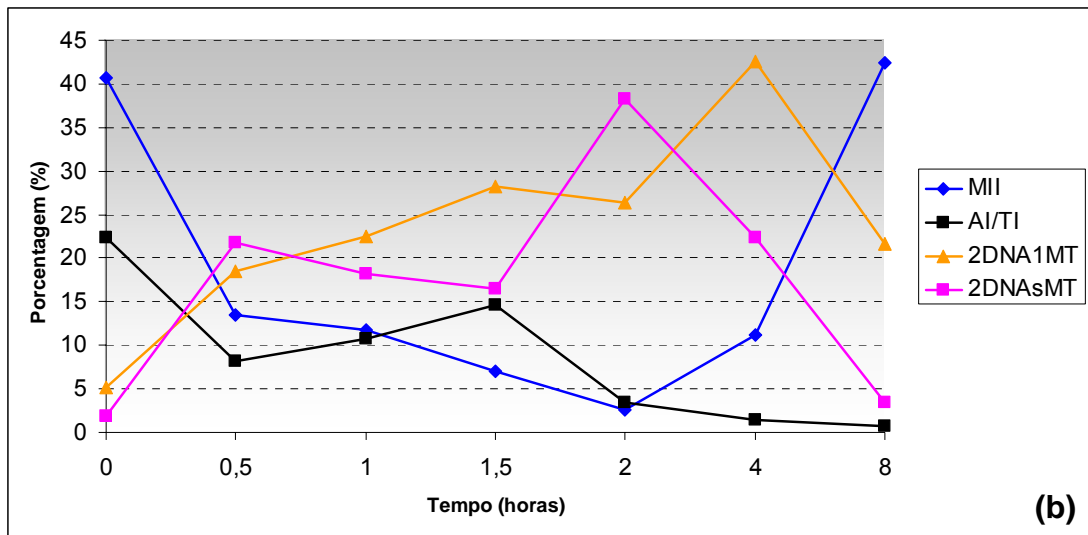
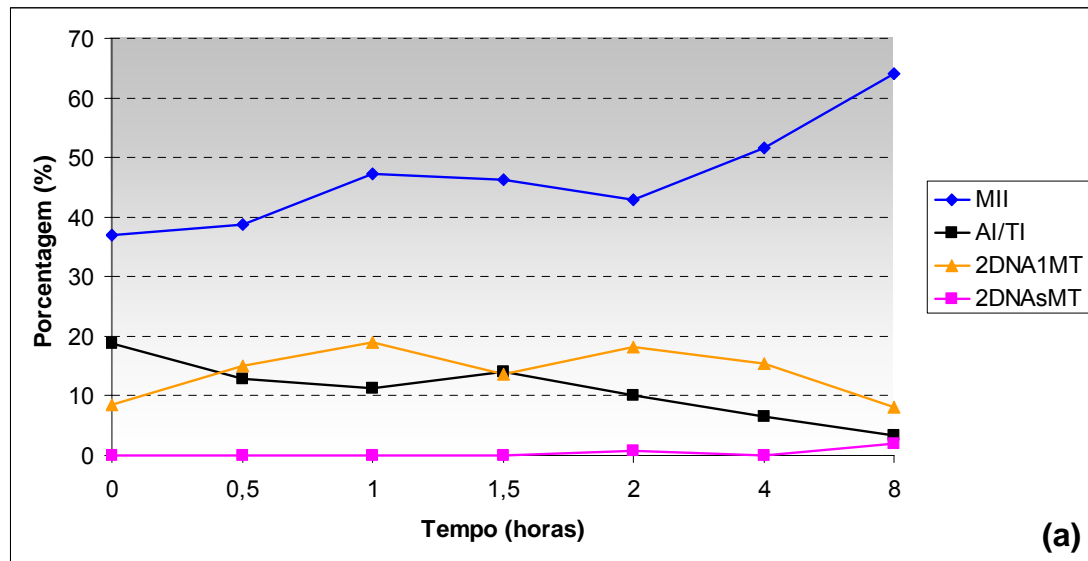
apenas um local), 2DNAMTrd (oócito em MII com redução de microtúbulos), 2DNAsMT (oócito em MII sem a presença de microtúbulos), 1DNA1MT (oócito em metáfase I com microtúbulos evidentes no mesmo local) e DNAfrag (DNA fragmentado com desorganização de microtúbulos). As outras categorias descritas no grupo 12 horas e não mencionadas aqui também foram avaliadas, mas por apresentarem médias próximas a zero, não foram consideradas.



**Figura 8.** Fotomicrografias de oócitos bovinos expostos à demecolcina em metáfase II (MII) e avaliados quanto à dinâmica nuclear e de microtúbulos. Categorias de oócitos encontradas: (a,b) MII – oócito em metáfase II com microtúbulos evidentes tanto no citoplasma do oócito quanto no corpúsculo polar; (c,d) AI/TI – oócito em transição anáfase/telófase I com fuso meiótico evidente; (e,f) 2DNA1MT – oócito em MII com microtúbulos evidentes em apenas um local; (g,h) 2DNAMTrd – oócito em MII com redução de microtúbulos; (i,j) 2DNAsMT – oócito em MII sem a presença de microtúbulos; (k,l) 1DNA1MT - oócito em metáfase I com microtúbulos evidentes no mesmo local. (a,c,e,g,i,k) Oócitos corados com Hoechst 33342; (b,d,f,h,j,l) oócitos corados com anticorpo anti- $\alpha$  tubulina (1:50) conjugado a FITC, observados em microscópio de epifluorescência. As setas indicam material nuclear (azul) e microtúbulos (verde).



**Figura 9.** Fotomicrografias de oócitos bovinos submetidos ao tratamento com demecolcina em MII por 2 horas, avaliados após 8 horas do início do tratamento (6 horas em meio livre de droga) apresentando fragmentação de DNA (categoria DNAfrag; a-c). Os oócitos foram corados com Hoechst 33342 e observados em microscópio de epifluorescência.



**Figura 10.** Representação gráfica da dinâmica nuclear e de microtúbulos de oócitos bovinos do (a) grupo controle e do (b) grupo demecolcina (expostos à demecolcina em MII por um período de 2 horas) avaliados a intervalos de 0,5 h nas primeiras 2 h de tratamento e após 4 e 8 h (em meio livre da droga). MII – oócito em metáfase II com microtúbulos evidentes tanto no citoplasma do oócito quanto no corpúsculo polar; AI/TI – oócito em transição anáfase/telófase I com fuso meiótico evidente; 2DNA1MT – oócito em MII com microtúbulos evidentes em apenas um local; 2DNAsMT – oócito em MII sem a presença de microtúbulos.

Como esperado, no início do tratamento houve predomínio de oócitos pertencentes à categoria MII (40,7%), ocorrendo diminuição significativa com apenas 0,5 h de exposição à demecolcina (13,5%). A média continuou a diminuir numérica, mas não estatisticamente ( $p > 0,05$ ) até 4 h, aumentando novamente ( $p < 0,05$ ) após 8 h do início do tratamento (42,4%). No grupo controle, não observamos diferença estatística entre as médias, que variaram entre 36,9% e 64,1% durante o período de avaliação.

Inicialmente, 22,4% dos oócitos apresentaram-se em AI/II, ocorrendo diminuição da média ( $p < 0,05$ ) com 0,5 h de tratamento (8,2%), que não diferiu estatisticamente dos momentos avaliados até 2 h de exposição à droga. Após 4 h e 8 h as médias diminuíram numérica, mas não estatisticamente (1,4 e 0,7%, respectivamente), diferindo apenas da média inicial, enquanto que, no grupo controle, observou-se 3,4% dos oócitos pertencentes a essa categoria na avaliação com 8 h.

Portanto, no início do tratamento (21 horas de maturação) encontramos a maioria dos oócitos em metáfase II (40,7%) ou anáfase/telófase I (22,4%). O processo de MIV demora normalmente entre 18 e 22 horas (SIRARD et al., 1989). Como submetemos os oócitos ao tratamento com 21 horas de maturação, as categorias encontradas nessa fase inicial são condizentes com os resultados esperados.

Aproximadamente 5,1% dos oócitos apresentaram-se na categoria 2DNA1MT no início do tratamento, observando-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) com 1 h (22,5%), 1,5 h (28,2%) e 2 h (26,4%) de tratamento. Após 4 h do início da exposição à droga, houve novo aumento dessa categoria (42,6%), sendo que, no grupo controle, 15,4% dos oócitos apresentaram essa configuração. Após 8 h do início do tratamento verificamos, aproximadamente, 21,7% dos oócitos pertencentes a essa categoria, não diferindo da média inicial.

Recentemente, LI et al. (2005) demonstraram toda a cinética nuclear e de microtúbulos em oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro*. De acordo com esses autores, os fusos meióticos passam de uma forma arredondada, nos estádios MI e MII, para uma forma cilíndrica, nos estádios AI e AII, formando uma estrutura semelhante a um cone (triângulo) nos estádios TI e TII. Além disso, ao contrário de outras espécies, nas quais os microtúbulos não são observados no 1º CP, em bovinos, eles são muitas

vezes extrusos com o 1º e 2º CP, que ficam completamente rodeados por essas estruturas. Portanto, oócitos com essas características (categoria 2DNA1MT) também foram encontrados neste experimento, chegando a 42,6% dos oócitos após 2 horas de tratamento e 2 horas de cultivo em meio livre de droga, ou seja, 25 horas de maturação, sendo possível verificar a presença de microtúbulos somente no corpúsculo polar em vários oócitos avaliados.

Oócitos pertencentes à categoria 2DNAMTrd não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o início do tratamento e todos os momentos avaliados. Por outro lado, na categoria 2DNAsMT, inicialmente, observou-se apenas 1,9% dos oócitos com essas características e, já com 0,5 h de exposição à demecolcina, houve aumento ( $p < 0,05$ ) para 21,8% dos oócitos apresentando ausência de microtúbulos. Essa média manteve-se sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) nos momentos avaliados até 4 h após o início do tratamento, ocorrendo diminuição ( $p < 0,05$ ) de oócitos pertencentes a essa categoria após 8 h (3,5%), cuja média foi semelhante ao início do tratamento. Já no grupo controle, verificamos médias entre 0 e 2,7% de oócitos sem microtúbulos durante a avaliação.

Assim como no grupo tratado com 12 horas de maturação, manifestações da demecolcina ocorreram em apenas 0,5 h de tratamento, traduzidas pelo aumento significativo da categoria 2DNAsMT (ausência de microtúbulos) e pela diminuição das categorias MII e AI/TI. De acordo com IBÁÑEZ et al. (2003) e GASPARRINI et al. (2003) efeitos da demecolcina em oócitos murinos foram evidentes 15 minutos após o início do tratamento, quando oócitos expostos à droga apresentaram diminuição de fuso e densidade de microtúbulos. Ainda, relataram que, embora a densidade tenha diminuído com o tempo de exposição à droga, os microtúbulos não desapareceram completamente, mesmo após 2 horas de tratamento. Portanto, os resultados observados nesse estudo, em oócitos bovinos, não estão de acordo com dados fornecidos por esses autores, uma vez que a categoria 2DNAMTrd (redução de microtúbulos) não apresentou alteração significativa ao longo do tempo e os microtúbulos desapareceram, em grande parte dos oócitos tratados, já com 0,5 h de exposição à droga. Dessa forma, oócitos bovinos parecem ser mais sensíveis à ação da

demecolcina, evidenciado pela rápida desestruturação e despolimerização dos microtúbulos.

Observamos 17,3% dos oócitos na categoria 1DNA1MT no início do tratamento, não sendo verificada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) com relação às médias encontradas nos outros momentos analisados. A categoria 1DNA1MT, provavelmente, representa oócitos imaturos, que não responderam à ação da droga. Esse índice de oócitos imaturos encontrado nesse experimento está dentro dos padrões obtidos em nossa rotina laboratorial. De acordo com Li et al. (2005) oócitos que não apresentam extrusão de CP ao término do processo de maturação, geralmente estão em estágio MI.

Observou-se aumento ( $p < 0,05$ ) da fragmentação de DNA, categoria DNAfrag, após 8 h do início do tratamento (11,1%) com relação a todos os momentos avaliados anteriormente (0 a 4 h), enquanto no grupo controle apenas 2,3% dos oócitos apresentaram fragmentação, no mesmo momento. Fragmentação de DNA acompanhada por desorganização dos microtúbulos também foi relatada por RUSSEL et al. (2005), que encontraram 11% dos oócitos avaliados com anormalidades de fuso.

Os resultados obtidos revelaram que houve nova polimerização dos microtúbulos, quando oócitos tratados por 2 horas com demecolcina foram cultivados em meio de maturação livre de droga por mais 6 horas (8 horas após o início do tratamento). Nesse momento, aproximadamente 42,4% dos oócitos apresentaram-se em configuração de MII, ou seja, com duas estruturas nucleares (metáfase e CP) e microtúbulos evidentes em ambos os locais. Esse resultado é de extrema importância se considerarmos que os microtúbulos, juntamente com os microfilamentos, estão envolvidos no processo de citocinese, estimulando a formação de anéis contráteis durante a anáfase, sendo necessários à completa separação das células-filhas (LARKIN e DANICHIK, 1999) e ainda, fundamentais em outras várias funções celulares.

### 5.3. Experimento III: Efeitos da demecolcina sobre a cinética da maturação nuclear e migração dos grânulos corticais em oócitos bovinos.

#### 5.3.1 - Oócitos em MI submetidos ao tratamento com demecolcina.

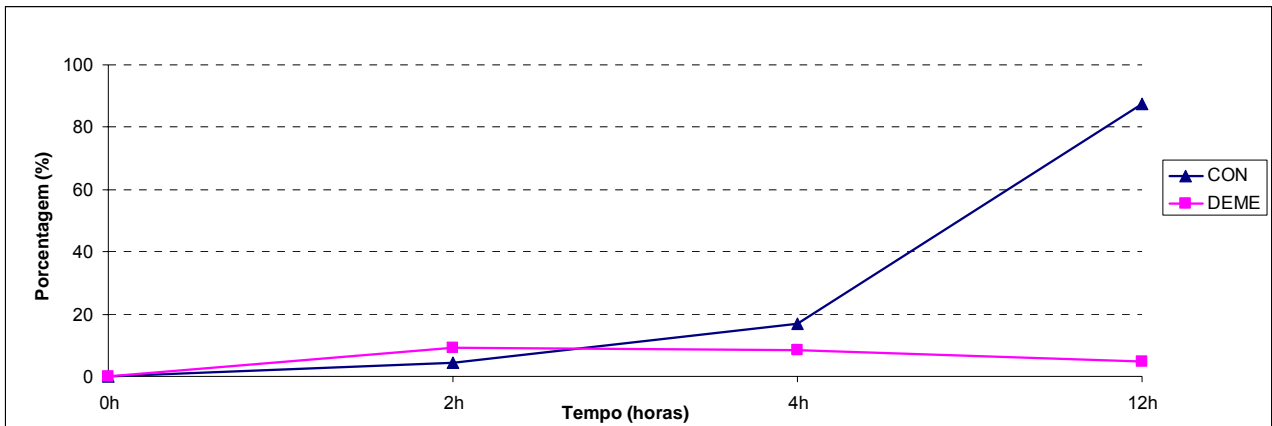
Oócitos com 12 horas de maturação foram expostos à demecolcina e avaliados quanto ao estágio de progressão nuclear e distribuição de grânulos corticais em 4 momentos após a exposição inicial à droga: 0, 2, 4 e 12 horas.

Os resultados obtidos quanto à maturação nuclear, após 24 horas de maturação para o grupo controle e para o grupo tratado (12 h de exposição à demecolcina), estão descritos na Tabela 4 e esquematizados na Figura 11.

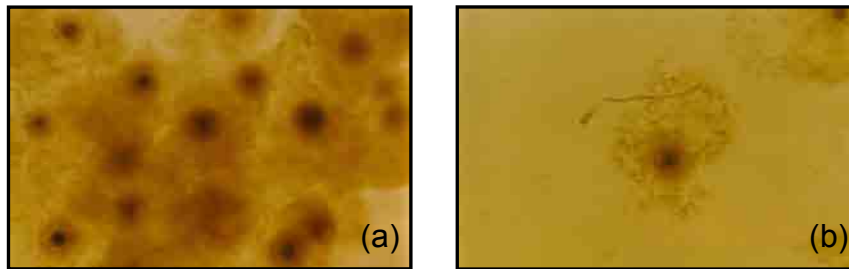
**Tabela 4.** Número (porcentagem) de oócitos em MI que atingiram o estágio de metáfase II (MII) após exposição à demecolcina por 12 horas. CON – oócitos do grupo controle; DEME – oócitos expostos à demecolcina.

Tratamento	MII			
	0h	2h	4h	12h
CON	0/59 (0)	2/46 (4,44) <sup>a,B</sup>	8/47 (17,08) <sup>a,B</sup>	43/49 (87,62) <sup>a,A</sup>
DEME	0/59 (0)	5/58 (9,23) <sup>a,B</sup>	5/60 (8,29) <sup>b,B</sup>	3/60 (4,92) <sup>b,B</sup>

<sup>a,b</sup> Valores com diferentes sobrescritos entre linhas diferem entre si ( $p < 0,05$ ). <sup>A,B</sup> Valores com diferentes sobrescritos entre colunas são diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11.** Representação gráfica da porcentagem de oócitos bovinos em metáfase II (com maturação nuclear) após o tratamento de oócitos em MI com demecolcina por um período de 12 h, completando-se 24 h de maturação. CON – oócitos do grupo controle; DEME – oócitos expostos à demecolcina.



**Figura 12.** Aspecto visual de oócitos bovinos após 24 horas de maturação *in vitro* no grupo controle (a) e no grupo tratado com demecolcina por 12 horas (b), mostrando incompleta expansão das células do *cumulus* no grupo tratado.

Oócitos expostos à demecolcina, avaliados após 12 horas de tratamento quanto à progressão ao estágio MII, não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação aos outros momentos avaliados (0, 2 e 4 horas), ao contrário do grupo controle. Houve interação entre as variáveis tempo e tratamento com 4 e 12 horas de exposição à droga. Enquanto, no grupo controle, a média de oócitos em estágio MII às 4 h foi de 17,1%, no grupo tratado, a média foi de 8,3% ( $p < 0,05$ ). Já com 12 h de tratamento, ou seja, 24 horas de maturação, observou-se grande diferença entre os grupos avaliados, sendo que o controle apresentou média de 87,6% dos oócitos em estágio MII e o grupo



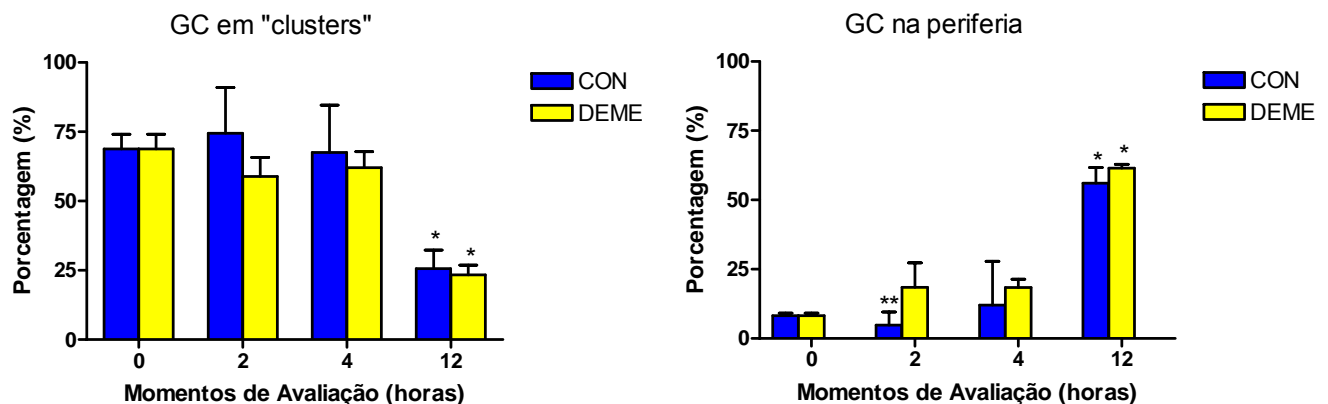
tratado, média de 4,9% ( $p < 0,05$ ). Observou-se também, em microscópio estereoscópico, incompleta expansão das células do *cumulus*, após o tratamento dos oócitos com demecolcina por 12 horas (Figura 12).

A distribuição de grânulos corticais após 24 horas de maturação, nos grupos controle e tratado, está descrita na Tabela 5 e esquematizada na Figura 13.

**Tabela 5.** Comportamento dos grânulos corticais (GC) [média (DP)] em oócitos bovinos submetidos à demecolcina em MI (12 horas de maturação), avaliados no início e com 2, 4 e 12 horas após o tratamento. CON – oócitos do grupo controle; DEME – oócitos do grupo tratado com demecolcina.

Tempo (h)	GC em "Clusters"		GC Periféricos	
	CON	DEME	CON	DEME
0	68,76 <sup>a,A</sup> (5,38)	68,76 <sup>a,A</sup> (5,38)	8,18 <sup>b,B</sup> (0,98)	8,18 <sup>b,B</sup> (0,98)
2	74,44 <sup>a,A</sup> (16,49)	58,86 <sup>a,A</sup> (6,88)	4,76 <sup>b,C</sup> (4,76)	18,42 <sup>b,B</sup> (8,87)
4	67,58 <sup>a,A</sup> (17,02)	62,05 <sup>a,A</sup> (5,77)	12,08 <sup>b,B</sup> (15,82)	18,41 <sup>b,B</sup> (3,00)
12	25,66 <sup>b,B</sup> (6,65)	23,41 <sup>b,B</sup> (3,46)	56,08 <sup>a,A</sup> (5,62)	61,46 <sup>a,A</sup> (1,43)

<sup>a,b</sup> Valores com diferentes sobrescritos entre linhas diferem entre si ( $p < 0,05$ ). <sup>A,B</sup> Valores com diferentes sobrescritos entre colunas (CON e DEME) dentro de cada categoria (GC em "Clusters", GC em Transição e GC Periféricos) são diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 13.** Distribuição de grânulos corticais em oócitos bovinos do grupo controle e do grupo deme (oócitos expostos à demecolcina em MI por um período de 12 horas) avaliados a intervalos de 2 h durante as primeiras 4 h e após 12 h de exposição à droga.

Embora não tenha sido verificada interação entre as variáveis tempo e tratamento, nos grupos controle e tratado, houve diferente comportamento ao longo do tempo. A média de oócitos com GC na periferia (oócitos maduros) no grupo controle, após 2 horas de exposição à demecolcina, foi de 4,8%, enquanto no grupo tratado a média foi de 18,4% dos oócitos avaliados. Porém, com 4 e 12 horas, esse efeito não se repetiu e não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos.

Não observou-se diferença ( $p>0,05$ ) quanto a presença de oócitos com GC em transição entre os grupos controle e tratado e no decorrer do tempo, com médias entre 14,0 e 23,0% dos oócitos com essa característica nos momentos avaliados.

A produção *in vitro* de embriões bovinos é um processo que envolve essencialmente três etapas: maturação, fecundação oocitária e cultivo embrionário (MOTLIK et al., 1998). A maturação nuclear ou meiótica constitui uma cascata de eventos nucleares induzida pelo pico de LH ou pela simples remoção do oócito de seu ambiente folicular (SIRARD et al., 2006). A maturação completa-se, aproximadamente, entre 18 e 22 horas do início da maturação, com a quebra da vesícula germinativa (GVBD), condensação dos cromossomos e extrusão do 1º CP, sendo que os oócitos permanecem em metáfase II até que ocorra fecundação ou ativação partenogénica.

Obtivemos bons índices de maturação nuclear no grupo controle (87,6%), considerando que normalmente 90% dos oócitos imaturos atingem maturação nuclear *in vitro* (LONERGAN et al., 2003), permitindo-nos, dessa forma, adequada interpretação dos resultados obtidos no grupo tratado. Manifestações da demecolcina, agente anti-mitótico desestabilizador de microtúbulos, foram observadas com 4 h de tratamento, em função do menor número de oócitos em estágio MII (8,3%) em relação ao grupo controle (17,0%). Essas manifestações tornaram-se críticas após 12 h de tratamento, quando o grupo exposto à droga apresentou apenas 4,9% dos oócitos em MII, mostrando claramente que a demecolcina prejudicou a progressão nuclear, já que há relatos de 85,5% dos oócitos em MII após 24 horas de maturação *in vitro* em condições livres de droga (LI et al. 2005).

A comunicação bi-direcional entre o oócito e as células somáticas foliculares é de extrema importância para a foliculogênese, crescimento e maturação oocitária (EPPIG,

2001). A morfologia das células do *cumulus* ao redor do oócito é normalmente utilizada como um critério de seleção anterior à MIV, e o grau de expansão dessas células pode ser utilizado como um indicador morfológico da qualidade oocitária após a maturação (ALI e SIRARD, 2002; LUCIANO et al., 2004), uma vez que as condições de cultivo que otimizam a MIV também promovem expansão das células do *cumulus*, como a suplementação com FSH e macromoléculas (EYESTONE e BOER, 1993; CHOI et al., 2001). Observamos que a exposição de oócitos imaturos à demecolcina promoveu incompleta expansão das células do *cumulus*, alterando provavelmente o metabolismo do oócito, já que as células do *cumulus* têm papel importante na utilização de substratos energéticos durante a MIV (SUTTON-MCDOWALL et al., 2004). Efeitos semelhantes na inibição da expansão das células do *cumulus* já haviam sido descritos em meios suplementados com roscovitina (MERMILLOD et al., 2000; COY et al., 2005), um inibidor seletivo de quinases dependentes de ciclina (CDKs) responsável pela manutenção da meiose estacionada no estágio de GV (WOUDEBERG et al., 2005).

Oócitos competentes meioticamente ainda requerem maturação citoplasmática, que fornece aos oócitos a capacidade de suportar a fecundação monospermica e o desenvolvimento embrionário inicial (MOTLIK et al., 1998). O padrão de distribuição dos grânulos corticais pode ser utilizado na avaliação da maturação citoplasmática, já que essa é associada a mudanças celulares que ocorrem durante a maturação nuclear, como migração dos grânulos corticais e reposicionamento das mitocôndrias (SIRARD, 2001). No experimento realizado, observou-se, em oócitos imaturos, que os GC arranjaram-se em “clusters” por todo o citoplasma do oócito. Após a maturação, os GC localizaram-se na periferia do oócito abaixo da membrana vitelínica. Como a reação cortical é gradual (RAZ et al., 1998), as fases citadas anteriormente não foram tão bem demarcadas, sendo que entre a fase de GC em “clusters” e GC periféricos, grânulos corticais foram encontrados em migração do centro para a periferia dos oócitos, caracterizando a chamada fase de transição.

Observamos comportamento diferente quanto à migração dos GC para a periferia, no grupo tratado, após 2 h de exposição à demecolcina. Maior média de oócitos com GC na periferia foi encontrada no grupo submetido à droga (18,4%) em

relação ao grupo controle (4,8%), demonstrando tendência do grupo tratado em antecipar os eventos da migração de grânulos corticais. Porém, ao final de 24 horas de maturação (12 horas de tratamento), verificou-se que esse efeito não se manteve, com médias de oócitos maduros (GC na periferia) semelhantes entre os grupos controle e tratado.

A maturação nuclear do oócito não é suficiente para resultar em subsequente desenvolvimento embrionário. Embora grande parte dos oócitos alcance maturação meiótica, há grande variação quanto aos estádios de maturação citoplasmática (WOUDENBERG et al., 2005). Na tentativa de mimetizar o período de pré-maturação *in vivo*, tem-se empregado agentes químicos que inibem a retomada da meiose temporariamente (cicloheximide, 6-dimetilaminopurina, butirolactona I, roscovitina, IBMX) ou ainda, inibidores fisiológicos (RICHARD et al., 1997; SAEKI et al., 1997; AVERY et al., 1998; KUBELKA et al., 2000; MERMILLOD et al., 2000; BARRETTO, 2003) permitindo maior tempo de maturação citoplasmática. Embora a demecolcina tenha perturbado a progressão nuclear, mantendo a meiose estacionada, não houve grande interferência desse agente na maturação citoplasmática, mostrando que a maturação nuclear e citoplasmática foram eventos independentes. Ainda, podemos concluir que o mecanismo de migração de grânulos corticais foi independente da organização de microtúbulos, considerando a ação desestruturadora da demecolcina.

No experimento anterior, verificamos a reversibilidade da ação da droga pelo cultivo de oócitos em meio livre de demecolcina após o tratamento desses, observando-se nova polimerização dos microtúbulos. SIRACUSA et al. (1980) também relataram que os efeitos da demecolcina são mais facilmente revertidos do que outras drogas como a colchicina ou vimblastina. Portanto, os resultados obtidos nesse experimento estão de acordo com os objetivos buscados quanto à sincronização da maturação nuclear e citoplasmática, desde que se prove a reversibilidade da ação da droga sobre o núcleo, já que ela permite adequada maturação citoplasmática, avaliada pelo comportamento dos GC. Esses resultados foram semelhantes aos descritos por COY et al. (2005) que também observaram migração prematura de GC para a periferia em oócitos expostos à roscovitina por 48 horas. Ainda, desde que se consiga otimizar esse

protocolo de enucleação química de oócitos em MI, o citoplasto fornecido por essa técnica apresentaria condições de suportar o desenvolvimento embrionário após a técnica de TN, devido aos índices satisfatórios de maturação citoplasmática.

Observamos neste experimento que a migração de grânulos corticais para a periferia dos oócitos, durante a maturação citoplasmática, foi independente da presença de microtúbulos, considerando a ação despolimerizadora da demecolcina sobre essas estruturas. Enquanto a migração de mitocôndrias, que também é um indício de maturação citoplasmática, foi considerada dependente de microtúbulos em suínos (SUN et al., 2001), a migração de GC para a periferia oocitária, parece ser mediada por microfilamentos em murinos (CONNORS et al., 1998) e ouriços-do-mar (WESSEL et al., 2002). Segundo estes últimos autores, os GC se fixam aos microfilamentos logo após a GVBD, migrando em direção à superfície celular.

Assim, os resultados obtidos em bovinos mostraram-se semelhantes aos obtidos em outras espécies e de acordo com dados da literatura, que sugerem a mediação da migração dos GC por outros componentes do citoesqueleto, como os microfilamentos.

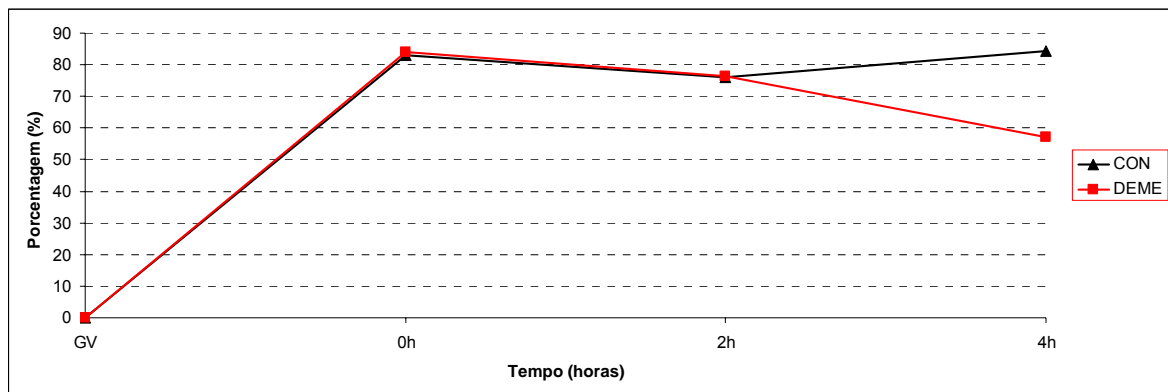
### **5.3.2 - Oócitos em MII submetidos ao tratamento com demecolcina.**

Oócitos obtidos antes (GV) e após a maturação por 21 horas (0 h) e 2 e 4 h após a exposição à demecolcina por 2 horas, foram avaliados quanto à maturação nuclear (Tabela 6 e Figura 14) e distribuição de grânulos corticais (Tabela 7 e Figura 15).

**Tabela 6.** Número (porcentagem) de oócitos bovinos no estágio metáfase II (MII), antes (GV) e após a maturação (0h) e 2 e 4h após exposição à demecolcina às 21 horas de maturação. CON – oócitos do grupo controle; DEME – oócitos expostos à demecolcina.

Tratamento	MII			
	GV	0h	2h	4h
CON	0/80 (0)	50/60 (82,92) <sup>a,A</sup>	54/70 (75,90) <sup>a,A</sup>	62/73 (84,48) <sup>a,A</sup>
DEME	0/80 (0)	54/66 (84,15) <sup>a,A</sup>	47/61 (76,35) <sup>a,A</sup>	46/70 (57,14) <sup>b,B</sup>

<sup>a,b</sup> Valores com diferentes sobrescritos entre linhas diferem entre si ( $p < 0,05$ ). <sup>A,B</sup> Valores com diferentes sobrescritos entre colunas são diferentes ( $p < 0,05$ ).



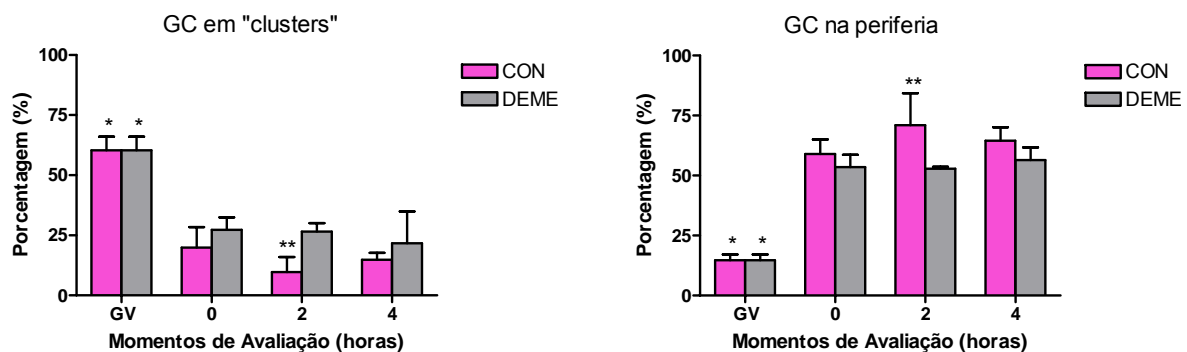
**Figura 14.** Representação gráfica da porcentagem de oócitos bovinos em metáfase II (com maturação nuclear) no estágio GV e após o tratamento desses, em MII, com demecolcina, nos momentos 0, 2 e 4 h. CON – oócitos do grupo controle; DEME – oócitos expostos à demecolcina.

Houve variação na média de oócitos, em estágio MII, no grupo tratado ao decorrer do tempo, enquanto, no grupo controle, não houve essa variação. Após 4 horas do início do tratamento, a média de oócitos em estágio MII, no grupo controle foi de 84,5%, sendo que, no grupo tratado, a média foi significativamente ( $p < 0,05$ ) menor (57,1%).

**Tabela 7.** Comportamento dos grânulos corticais (GC) [média (DP)] em oócitos bovinos submetidos à demecolcina após 21 horas de maturação por um período de 2 horas, avaliados no estágio GV, início (0 h), 2 e 4 horas após o tratamento. CON – oócitos do grupo controle; DEME – oócitos do grupo tratado com demecolcina.

Tempo (h)	GC em "Clusters"		GC Periféricos	
	CON	DEME	CON	DEME
GV	60,39 <sup>a,A</sup> (5,67)	60,39 <sup>a,A</sup> (5,67)	14,68 <sup>b,C</sup> (2,41)	14,68 <sup>b,C</sup> (2,41)
0	19,89 <sup>b,B</sup> (8,50)	27,31 <sup>b,B</sup> (5,16)	58,92 <sup>a,A</sup> (6,14)	53,58 <sup>a,A</sup> (5,05)
2	9,73 <sup>b,C</sup> (6,24)	26,52 <sup>b,B</sup> (3,54)	70,94 <sup>a,A</sup> (13,39)	52,91 <sup>a,B</sup> (0,72)
4	14,80 <sup>b,B</sup> (2,94)	21,69 <sup>b,B</sup> (13,25)	64,50 <sup>a,A</sup> (5,59)	56,46 <sup>a,A</sup> (5,22)

<sup>a,b</sup> Valores com diferentes sobrescritos entre linhas diferem entre si ( $p < 0,05$ ). <sup>A,B</sup> Valores com diferentes sobrescritos entre colunas (CON e DEME) dentro de cada categoria (GC em "Clusters", GC em Transição e GC Periféricos) são diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 15.** Representação gráfica da distribuição de grânulos corticais em oócitos bovinos do grupo controle e do grupo deme (oócitos expostos à demecolcina após 21 horas de maturação por um período de 2 horas) avaliados em GV e em intervalos de 2 h até 4 h após o início do tratamento.

Quanto à distribuição de GC, houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos após 2 horas de exposição à demecolcina, com média de 70,9% dos oócitos com GC na periferia (maturos) no grupo controle e 52,9% no grupo tratado. Nos outros momentos avaliados (GV; 0 e 4 horas de tratamento) não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Não observou-se diferença ( $p>0,05$ ) quanto ao número de oócitos com GC em transição entre os grupos controle e tratado e no decorrer do tempo, com médias entre 12,0 e 21,6% dos oócitos apresentando essa característica nos momentos avaliados.

Como utilizamos oócitos com 21 horas de maturação neste estudo e alguns eventos finais da maturação ainda estão acontecendo, optamos por avaliar se a demecolcina também estaria agindo nessa etapa final da maturação. De acordo com os resultados obtidos, verificamos ação prejudicial da demecolcina na extrusão do corpúsculo polar em oócitos que ainda não haviam finalizado a maturação meiótica. Como a maturação nuclear normalmente se completa entre 18 e 24 horas de MIV (SIRARD et al., 1989), possivelmente parte dos oócitos ainda apresentava-se em AI/TI no início do tratamento, conforme demonstramos no Experimento II (22,4% dos oócitos) e, dessa forma, a demecolcina prejudicou a extrusão do 1º CP nos mesmos. Esses resultados também podem ser explicados por uma consideração feita em humanos por ELCHENLAUB-RITTER et al. (1995), ao observarem que o prolongamento do bloqueio do oócito em MII antes da fecundação era acompanhado de degeneração do 1º CP. Essa informação também confirmaria os resultados obtidos, já que com a degeneração do 1º CP, a visualização do estágio da meiose fica comprometida, induzindo-nos a pensar que oócitos em MII estejam no estágio MI.

A maturação citoplasmática está associada a mudanças celulares como a migração de GC e reposicionamento de mitocôndrias, sendo que essas alterações preparam os oócitos para a fecundação (SIRARD et al., 2001). Assim como observado na avaliação da maturação nuclear, verificamos também certa influência negativa da demecolcina na distribuição de grânulos corticais após 2 h de tratamento, evidenciando, portanto, a rápida atuação desse agente desorganizador de microtúbulos. Mas, após 4 h do início do tratamento, esse efeito não se repetiu, ocorrendo uma adequada migração dos GC.

Pelo nosso conhecimento não há relatos anteriores a este trabalho quanto à avaliação dos efeitos da demecolcina em oócitos bovinos. Apesar desse agente já ter sido utilizado em muitos procedimentos de enucleação química, sua ação tanto no

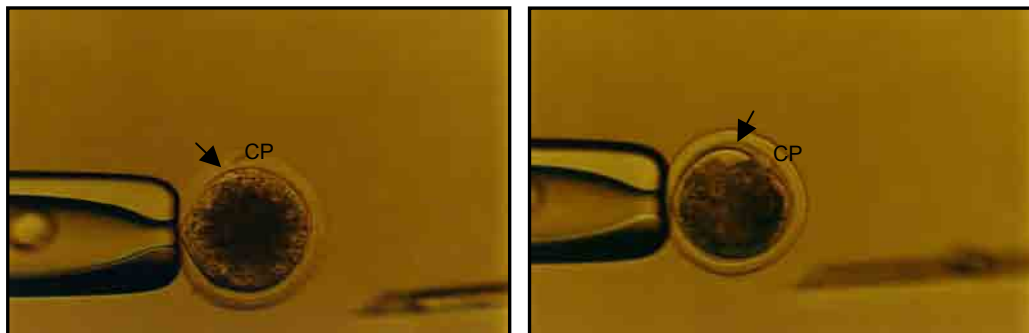


processo de maturação, quanto na composição de microtúbulos, ainda não haviam sido avaliados, em oócitos bovinos.

#### 5.4. Experimento IV: Eficiência da técnica de enucleação assistida quimicamente pela demecolcina e desenvolvimento embrionário após o procedimento de transferência nuclear.

##### 5.4.1 - Eficiência da técnica de enucleação

Oócitos maturados *in vitro* por 21 horas, expostos à demecolcina nas últimas duas horas de maturação, foram avaliados quanto à formação de protrusão na região cortical e aqueles que a possuíam foram enucleados (Figura 16). Posteriormente, procedeu-se a verificação da eficácia da técnica. Os resultados de todas as repetições realizadas estão descritos na Tabela 8.



**Figura 16.** Fotomicrografias de oócitos bovinos submetidos ao tratamento com demecolcina por 2 horas, após 19 horas de maturação, antes do procedimento de enucleação. (a) formação de protrusão próxima ao 1º CP. A seta indica a protrusão formada; (b) área translúcida com leve protuberância na região cortical próxima ao CP. A seta indica a formação da protuberância.

**Tabela 8.** Eficiência da técnica de enucleação (porcentagem) em oócitos bovinos submetidos ao tratamento com demecolcina por 2 h após 19 horas de maturação.

<b>Repetições</b>	<b>Oócitos tratados</b>	<b>Enucleados</b>
<b>1</b>	<b>30</b>	<b>28 (93,3)</b>
<b>2</b>	<b>30</b>	<b>27 (90,0)</b>
<b>3</b>	<b>25</b>	<b>22 (88,0)</b>
<b>Total</b>	<b>85</b>	<b>77 (90,6)</b>

Após o procedimento de coloração dos citoplastos com Hoechst 33342, verificou-se alta eficácia da técnica de enucleação (90,6%), possibilitando o uso dessa em procedimentos posteriores de transferência nuclear sem a necessidade de coloração do núcleo, orientando-se somente pelo CP e protrusão.

#### 5.4.2 - Desenvolvimento embrionário

Em microscópio óptico invertido (Olympus IX-70), foram avaliados 515 oócitos, dos quais 219 (42,5%) possuíam protrusão e estavam aptos a serem enucleados (Tabela 9).

**Tabela 9.** Número (porcentagem) de oócitos bovinos expostos à demecolcina por 2 horas após 19 horas de maturação e enucleados após seleção de CP ou protrusão em microscópio estereoscópico.

<b>Repetição</b>	<b>Oócitos avaliados</b>	<b>Enucleados</b>
<b>1</b>	<b>188</b>	<b>90 (47,9%)</b>
<b>2</b>	<b>127</b>	<b>54 (42,5%)</b>
<b>3</b>	<b>200</b>	<b>75 (37,5%)</b>
<b>Total</b>	<b>515</b>	<b>219 (42,5%)</b>

Utilizando-se a técnica de transferência nuclear, foram transferidas com êxito linhas celulares de fibroblastos para 203 oócitos enucleados, permitindo a reconstituição desses. Uma vez efetuada a eletrofusão após a transferência nuclear, verificou-se a fusão celular de 80 oócitos com fibroblastos (46,8%), sendo que 25 oócitos (12,7%) apresentaram-se lisados após o procedimento de fusão (Tabela 10).

**Tabela 10.** Taxa (porcentagem) de reconstituição, fusão e lise em embriões bovinos submetidos ao procedimento de transferência nuclear com a técnica de enucleação assistida quimicamente pela demecolcina.

Repetição	Reconstituição	Fusão	Lise
1	83/90 (92,2%)	39/69 (56,5%)	10/79 (12,6%)
2	50/54 (92,6%)	17/44 (38,6%)	5/49 (10,2%)
3	70/75 (93,3%)	24/58 (41,4%)	10/68 (14,7%)
<b>Total</b>	<b>203/219 (92,7%)</b>	<b>80/171 (46,8%)</b>	<b>25/196 (12,7%)</b>

Após a ativação artificial (ionomicina e 6-DMAP) dos oócitos fundidos por 4 horas, esses foram submetidos ao cultivo em meio SOF (como já mencionado anteriormente) e avaliados quanto à clivagem após 48 horas e à taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto após 7 dias de cultivo. Os resultados estão expressos na Tabela 11.

**Tabela 11.** Avaliação da taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto em embriões bovinos reconstituídos por transferência nuclear (TN) após procedimento de enucleação assistida quimicamente pela demecolcina.

Repetição	Cultivados	Clivagem	Blastocistos
1	25	22 (88,0%)	6 (24,0%)
2	17	14 (82,3%)	8 (47,0%)
3	16	13 (81,2%)	2 (12,5%)
<b>Total</b>	<b>58</b>	<b>49 (84,5%)</b>	<b>16 (27,6%)</b>

Embora vários nascimentos de clones a partir de células somáticas tenham sido relatados em diversas espécies (WILMUT et al., 1997; CIBELLI et al., 1998; WAKAYAMA et al., 1998; BAGUISI et al., 1999; ONISHI et al., 2000; YAMAZAKI et al., 2005), a eficiência dessas técnicas empregadas na clonagem ainda é extremamente baixa. Na tentativa de se minimizar as injúrias causadas aos oócitos durante o procedimento de enucleação, técnicas alternativas de enucleação química têm sido relatadas, permitindo inclusive nascimentos em várias espécies como suínos (YIN et al., 2002b; KAWAKAMI et al., 2003), coelhos (YIN et al., 2002a) e murinos (BAGUISI e OVERSTROM, 2000; GASPARRINI et al., 2003).

A exposição de oócitos em MII à demecolcina proporcionou altas taxas de enucleação em suínos, com 93% (YIN et al., 2002b) e 95% de eficácia (KAWAKAMI et al., 2003) e bovinos, nos quais foram atingidas taxas de 96% (LI et al., 2004) e 98% (VAJTA et al., 2004) de eficiência na enucleação. Neste experimento, obtivemos média de 90,6% de oócitos enucleados por essa técnica e, portanto, esses resultados corroboram com os dados fornecidos pelos autores citados, mostrando que a técnica de enucleação assistida pela demecolcina apresenta alta confiabilidade em oócitos bovinos, eliminando a necessidade do uso de corantes específicos de DNA, responsáveis por vários danos causados aos oócitos (SMITH, 1993), inclusive comprometendo o posterior desenvolvimento embrionário (DOMINKO et al., 2000). Ainda, YIN et al. (2002b) e KAWAKAMI et al. (2003) obtiveram, em seus estudos, maior eficiência na enucleação assistida pela demecolcina (92 a 95%) do que no procedimento tradicional, com aspiração de parte do citoplasma ao redor do 1º corpúsculo polar (79 % e 67%, respectivamente).

Durante o procedimento de TN, obtivemos 42,5% dos oócitos com formação de protrusão e, portanto, aptos a serem enucleados. No Experimento I, observamos 55,1% dos oócitos com protrusão e esse fato pode ser explicado pela diferença do momento de exposição à demecolcina, já que, no primeiro experimento, foram utilizados oócitos com 21 horas de maturação e, no último, oócitos maturados por apenas 19 horas. Esse tratamento mais precoce foi realizado em função do rápido deslocamento da placa metafásica em relação ao corpúsculo polar. Verificamos, anteriormente, que oócitos

tratados com 21 horas de maturação apresentaram a formação de protrusão distante do CP, dificultando a enucleação e, muitas vezes, exigindo a realização de duas perfurações com a micropipeta para que o processo de enucleação fosse executado. Dessa forma, antecipamos o momento de exposição dos oócitos à demecolcina e obtivemos, na maioria dos oócitos, a formação de protrusão bem próxima ao CP, facilitando o procedimento. Porém, como consequência dessa antecipação, alguns oócitos ainda não se apresentavam em MII, determinando, assim, média inferior de oócitos com protrusão.

Obtivemos média de 84,5% de embriões clivados, resultados próximos àqueles obtidos em nossa rotina laboratorial com embriões oriundos da produção *in vitro*. Verificamos grande variação quanto ao desenvolvimento de embriões até o estágio de blastocisto, com taxas de 12,5 a 47% e média de 27,6% de blastocistos. LI et al. (2004) relataram taxas de 30,2% de blastocistos com o uso dessa técnica em oócitos bovinos, em sistema de co-cultivo, enquanto VAJTA et al. (2004) obtiveram taxas de 47%. Nossos dados ficaram próximos aos resultados obtidos por esses autores, considerando a grande variação obtida.

O mesmo protocolo de ativação (ionomicina e 6-DMAP) foi utilizado por YAMAZAKI et al. (2005) na TN tradicional em bovinos, com relato de 67,9 a 88,1% de embriões clivados e 14,4% de blastocistos. O bloqueio embrionário ocorre em embriões bovinos principalmente no estágio de 8 células e está mais relacionado com a qualidade citoplasmática do oócito (MEIRELLES et al., 2004). Acredita-se que dois mecanismos sejam causadores do bloqueio embrionário: a incapacidade em superar a repressão da cromatina e ativar importantes genes de desenvolvimento e reação às injúrias causadas pelo ambiente de cultivo (BETTS e KING, 2001). O uso da demecolcina poderia ser uma injúria adicional, porém de acordo com os resultados obtidos, não verificamos ação prejudicial da droga já que os índices de clivagem e produção de blastocistos foram semelhantes ou superiores àqueles relatados em clones obtidos por TN tradicional. Já KATO et al. (1992) verificaram que o tratamento prolongado (12,5 a 14,5 h) de embriões murinos com demecolcina afetou negativamente o desenvolvimento.

A técnica de enucleação de oócitos pré-ativados expostos à demecolcina também tem permitido o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto em murinos e bovinos, com relatos de 14% e 19%, respectivamente (GASPARRINI et al., 2003; RUSSEL et al., 2005). Portanto, no experimento relatado neste trabalho, melhores índices de desenvolvimento embrionário foram alcançados com a técnica de enucleação de oócitos em MII assistida pela demecolcina.

A melhor forma de se verificar a qualidade embrionária é avaliar sua habilidade em estabelecer prenhez e produzir animais saudáveis (LONERGAN et al., 2003). Ainda não foram relatados nascimentos de clones bovinos com o uso da técnica de enucleação assistida pela demecolcina. Além da avaliação quanto ao desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, a qualidade desses embriões avaliada pela transferência *in vivo* e capacidade de estabelecimento de gestações e nascimentos ainda deve ser elucidada. Dessa forma, há necessidade de mais estudos concentrados nessa área, inclusive avaliando-se os padrões de expressão gênica de embriões e fetos obtidos pela técnica.

## 6. CONCLUSÕES

A demecolcina foi capaz de promover enucleação oocitária;

A demecolcina pode ser usada em concentrações inferiores às utilizadas rotineiramente na indução de enucleação oocitária;

Verificou-se formação de protrusão cortical em oócitos expostos à demecolcina em metáfase I e metáfase II, contendo todo o material nuclear condensado;

Observou-se rápido efeito da demecolcina na organização de microtúbulos em oócitos bovinos (30 minutos), indicando alta sensibilidade destes à ação da droga;

Houve nova polimerização de microtúbulos em oócitos bovinos expostos à demecolcina em metáfase II;

Embora a demecolcina tenha perturbado a progressão nuclear, provocando bloqueio do ciclo celular meiótico, não houve ação prejudicial desse agente na maturação citoplasmática, mostrando que a maturação nuclear e citoplasmática foram eventos independentes;

O mecanismo de migração de grânulos corticais foi independente da organização de microtúbulos em oócitos bovinos;

A técnica de enucleação assistida pela demecolcina apresentou-se altamente eficiente e confiável, eliminando a necessidade do uso de corantes específicos de DNA e exposição dos oócitos à irradiação UV;

Não foi observada ação prejudicial da demecolcina no desenvolvimento embrionário em bovinos.

## 7. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J., RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 4. ed., New York: Garland Science, 2002. 1493p.

ALI, A.; SIRARD, M. A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 66, p. 901-905, 2002.

ARAKI, K.; NAITO, K.; HARAGUCHI, S.; SUZUKI, R.; YOKOYAMA, M.; INOUE, M.; AIZAWA, S.; TOYODA, Y.; SATO, E. Meiotic abnormalities of c-mos Knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 55, p. 1315-1324, 1996.

AVERY, B.; HAY-SCHMIDT, A.; HYTTEL, P.; GREEVE, T. Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylaminopurine prior to *in vitro* maturation. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 50, p. 334-344, 1998.

BAGUISI, A.; BEHDOODI, E.; MELICAN, D. T.; POLLOCK, J. S.; DESTREMPES, M. M.; CAMMUSO, C.; WILLIAMS, J. L.; NIMS, S. D.; PORTER, C. A.; MIDURA, P.; PALACIOS, M. J.; AYRES, S. L.; DENNISTON, R. S.; HAYES, M. L.; ZIOMEK, C. A.; MEADE, H. M.; GODKE, R. A.; GAVIN, W. G.; OVERSTROM, E. W.; ECHELARD, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat. Biotechnol.**, New York, v. 17, p. 456-461, 1999.

BAGUISI, A.; OVERSTROM, E. W. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, p. 209, 2000.



BARNES, F. L.; EYESTONE, W. H. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 33, p. 141-152, 1990.

BARRETTO, L. **Avaliação dos efeitos do 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX) e da roscovitina sobre a maturação nuclear, momento de fecundação e competência no desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos.** 2003. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

BARTELS, P.; JOUBERT, J.; De la REY, M.; De la REY, R.; TREADWELL, R.; CALLESEN, H.; VAJTA, G. Birth of Africa's first nuclear transferred animal produced with handmade cloning. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v. 16, p. 136, 2004.

BARTON, N. R.; GOLDSTEIN, L. S. B. Going mobile: microtubule motors and chromosome segregation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 93, p. 1735-1742, 1996.

BETTS, D. H.; KING, W. A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 171-191, 2001.

BHOJWANI, S.; VAJTA, G.; CALLESEN, H.; ROSCH LAU, K.; KUWER, A.; BECKER, F.; ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; POEHLAND, R. Developmental competence of HMD™ derived bovine cloned embryos obtained from somatic cell nuclear transfer of adult fibroblasts and granulosa cells. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 51, p. 465-475, 2005.

BONDIOLI, K. R.; WESTHUSIN, M. E.; LOONEY, C. R. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 33, p. 165-174, 1990.

BOOTH, P. J.; TAN, S. J.; HOLM, P.; CALLESEN, H. Application of the zona-free manipulation technique to porcine somatic nuclear transfer. **Cloning Stem Cells**, Lanchmont, v. 3, p. 191-197, 2001b.

BOOTH, P. J.; TAN, S. J.; REIPURTH, R.; HOLM, P.; CALLESEN, H. Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona-free manipulation technique. **Cloning Stem Cells**, Lanchmont, v. 3, p. 139-150, 2001a.

BORDIGNON, V.; CLARKE, H. J.; SMITH, L. C. Developmentally regulated loss and reappearance of immunoreactive somatic histone H1 on chromatin of bovine morula-stage nuclei following transplantation into oocytes. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 61, p. 22-30, 1999.

BORDIGNON, V.; SMITH, L. C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 49, p. 29-36, 1998.

BRIGGS, R.; KING, T. J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 38, p. 455-463, 1952.

BRUNET, S.; VERNOS, I. Chromosome motors on the move. **EMBO Rep.**, Oxford, v. 2, p. 669-673, 2001.

CAMPBELL, K. H. S.; LOI, P.; OTAEGUI, P.J.; WILMUT, I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. **Rev. Reprod.**, Colchester, v. 1, p. 40-46, 1996.

CAMPBELL, K. H. S. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. **Cloning**, Lanchmont, v. 1, p. 3-15, 1999.

CHEONG, H.; TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 48, p. 958-963, 1983.

CHERR, G. N.; DROBNIS, E. Z.; KATZ, D. F. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **J. Exp. Zool.**, New York, v. 246, p. 81-93, 1988.

CHOI, Y. H.; CARNEVALE, E.M.; SEIDEL, G. E.; SQUIRE, E. L. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. **Theriogenology**, Stoneham, v. 56, p. 661-670, 2001.

CIBELLI, J. B.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; KANE, J. J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONCE DE LEON, F. A.; ROBL, J. M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, Washington, v. 280, p. 1256-1258, 1998.

CONNORS, S. A.; KANATSU-SHINOHARA, M.; SCHULTZ, R. M.; KOPF, G. S. Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs. **Dev. Biol.**, New York, v. 200, p. 103-115, 1998.

COY, P.; ROMAR, R.; PAYTON, R. R.; McCANN, L.; SAXTON, A. M.; EDWARDS, J. L. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. **Reproduction**, Cambridge, v. 129, p. 19-26, 2005.

CRAN, D. G. The distribution of organelles in mammalian oocytes following centrifugation prior to injection of foreign DNA. **Gamete Res.**, New York, v. 18, p. 67-76, 1987.

CZOŁOWSKA, R.; MODLINSKI, J. A.; TARKOWSKI, A. K. Behavior of thymocyte nuclei in non activated and activated mouse oocytes. **J. Cell Sci.**, London, v. 69, p. 19-34, 1984.

DANIELS, R.; HALL, V.; TROUNSON, A. O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 63, p. 1034-1040, 2000.

DEKEL, N. Molecular control of meiosis. **Trends Endocrinol. Metab.**, New York, v. 6, p. 165-169, 1995.

De SOUSA, P. A.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L. E.; WALKER, S. K.; WILMUT, I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 65, p. 23-30, 2001.

De SOUSA, P. A.; WINGER, Q.; HILL, J. R.; JONES, K.; WATSON, A. J.; WESTHUSIN, M. E. Reprogramming of fibroblast nuclei after transfer into bovine oocytes. **Cloning**, Lanchmont, v. 1, p. 63-69, 1999.

DOMINKO, T.; CHAN, A.; SIMERLY, C.; LUETJENS, C. M.; HEWITSON, L.; MARTINOVICH, C.; SCHATTEN, G. Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 62, p. 150-154, 2000.

DOMINKO, T.; FIRST, N. L. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryonic development. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 47, p. 456-467, 1997.

EICHENLAUB-RITTER, U.; SCHMIADY, H.; KENTENICH, H.; SOEWARTO, D. Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. **Hum. Reprod.**, Oxford, v. 10, p. 2343-2349, 1995.

ELSHEIKH, A. S.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Developmental ability of mouse late 2-cell stage blastomeres fused to chemically enucleated oocytes in vitro. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 59, p. 107-113, 1997.

ELSHEIKH, A. S.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S.; KANAGAWA, H. Functional enucleation of mouse metaphase II oocytes with etoposide. **J. Vet. Res.**, Chicago, v. 45, p. 217-220, 1998.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, p. 829-838, 2001.

EYESTONE, W. H.; BOER, H. A. FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. **Theriogenology**, Stoneham, v. 39, p. 216, 1993.

FULKA, J.; LOI, P.; FULKA, H.; PTAK, G.; NAGAI, T. Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v. 22, p. 279-283, 2004.

FULKA, J.; MOOR, R.M. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 34, p. 427-430, 1993.

GARD, D. L.; CHA, B. J.; SCHROEDER, M. M. Confocal immunofluorescence microscopy of microtubules, microtubule-associated proteins, and microtubule-

organizing centers during amphibian oogenesis and early development. **Curr. Top. Dev. Biol.**, New York, v. 31, p. 383-431, 1995.

GARTNER, K.; BONDIOLI, K.; HILL, K.; RAPP, K. High variability of body sizes within nucleus transfer clones of calves: artifacts or a biological feature? **Reprod. Domest. Anim.**, Berlin, v. 33, p. 67-75, 1998.

GASPARRINI, B.; DINNYES, A.; AINSLIE, A.; MARSHALL, C.; RITCHIE, W. A.; TRAVERS, A.; WILMUT, I.; De SOUSA, P. A. Attempted chemical enucleation of *in vitro* matured sheep oocytes after activation and their use in nuclear transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 414, 2002.

GASPARRINI, B.; GAO, S.; AINSLIE, A.; FLETCHER, J.; MC GARRY, M.; RITCHIE, W. A.; SPRINGBETT, A. J.; OVERSTRÖM, E. W.; WILMUT, I.; DE SOUSA, P. A. Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 68, p. 1259-1266, 2003.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford: CAB International, 1994. 640p.

GREISING, T.; MONOGHAN, P.; HEALY, A.; GORDON, A.; GALLAGHER, M.; WAHID, H.; GORDON, I. The influence of cytoplasm in recipient oocytes on the developmental capacity of bovine nuclear transfer embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 208, 1994.

HAGEMANN, L. J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. **Theriogenology**, Stoneham, v.51, p.449-459, 1999.

HARI, M.; WANG, Y.; VEERARAGHAVAN, S.; CABRAL, F. Mutations in  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin that stabilize microtubules and confer resistance to colcemid and vinblastine. **Mol. Cancer Therap.**, Birmingham, v. 2, p. 597-605, 2003.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LeBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 66, p. 6-13, 2002.

HEYMAN, Y.; RENARD, J.P. Cloning of domestic species. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 42, p. 427-436, 1996.

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T.; SPENCER, T. E.; THOMPSON, J. A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 63, p. 1787-1794, 2000a.

HILL, J. R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p. 1451-1465, 1999.

HILL, J. R.; WINGER, Q. A.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; THOMPSON, J. A.; WESTHUSIN, M. E. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 62, p. 1135-1140, 2000b.

HIRAO, Y.; EPPIG, J. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in the strain LT mouse oocyte: participation of MOS. **Development**, Cambridge, v. 124, p. 5107-5113, 1997.

HOMA, S. T. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 40, p. 122-134, 1995.

HOMA, S. T. Effects of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of *cumulus*-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium. **J. Exp. Zool.**, New York, v. 248, p. 222-231, 1988.

IBÁÑEZ, E.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTRÖM, E. W. Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell-cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 68, p. 1249-1258, 2003.

IBÁÑEZ, E.; SANFINS, A.; COMBELLES, C.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTROM, E. W. Induced enucleation of mouse and goat oocytes: kinetic and phenotypic characterizations. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 421, 2002.

ILLMENSEE, K.; HOPPE, P.C. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell**, Cambridge, v. 23, p. 9-18, 1981.

JULIAN, M.; TOLLON, Y.; LAJOIE-MAZENC, I.; MOISAND, A.; MAZARGUIL, H.; PUGET, A.; WRIGHT, M.  $\lambda$ -Tubulin participates in the formation of the midbody during cytokinesis in mammalian cells. **J. Cell Sci.**, London, v. 105, p. 145-156, 1993.

KANKA, J.; SMITH, S. D.; SOLOY, E.; HOLM, P.; CALLESEN, H. Nucleolar ultrastructure in bovine nuclear transfer embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 52, p. 253-263, 1999.

KARNIKOVA, L.; HORSKA, M.; TOMANEK, M.; KANKA, J.; URBAN, F.; MOOR, R.; FULKA, J. Chemically enucleated mouse oocytes: ultrastructure and kinetics of histone H1 kinase activity. **Reprod. Nutr. Dev.**, Paris, v. 38, p. 643-651, 1998.



KATO, Y.; TANI, T.; SOTOMARU, Y.; KUROKAWA, K.; KATO, J-Y.; DOGUCHI, H.; YASUE, H.; TSUNODA, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**, Washington, v. 282, p. 2095-2098, 1998.

KATO, Y.; TANI, T.; TSUNODA, Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 120, p. 231-237, 2000.

KATO, Y.; TSUNODA, Y. Synchronous division of mouse two-cell embryos with nocodazole *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 95, p. 39-43, 1992.

KAWAKAMI, M.; TANI, T.; YABUUCHI, A.; KOBAYASHI, T.; MURAKAMI, H.; FUJIMURA, T.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes. **Cloning Stem Cells**, Lanchmont, v. 5, p. 379-387, 2003.

KIM, N.H. Development of a nonmechanical enucleation method using x-ray irradiation in somatic cell nuclear transfer. **Fertil. Steril.**, Birmingham, v. 82, p. 963-965, 2004.

KIM, N-H.; FUNAHASHI, H.; PRATHER, R.S.; SCHATTEN, G.; DAY, B.N. Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 43, p. 248-255, 1996.

KNOCKAERT, M.; GREENGARD, P.; MEIJER, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v. 23, p. 417-425, 2002.

KONO, T. Influence of epigenetic changes during oocyte growth on nuclear reprogramming after nuclear transfer. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v. 10, p. 593-598, 1998.

KONO, T. Nuclear transfer and reprogramming. **Rev. Reprod.**, Colchester, v. 2, p. 74-80, 1997.

KONO, T.; SOTOMARU, Y.; AONO, F.; TAKAHASI, T.; OGIWARA, I.; SEKIZAWA, F.; ARAI, T.; NAKAHARA, T. Effect of ooplast activation on the development oocytes following nucleus transfer in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 1463-1471, 1994.

KONO, T.; TSUNODA, Y. Effects of induction current and other factors on large scale electrofusion for pronuclear transplantation of mouse eggs. **Gamete Res.**, New York, v. 19, p. 349-357, 1988.

KRAGH, P. M.; DU, Y.; CORYDON, T. J.; PURUP, S.; BOLUND, L.; VAJTA, G. Efficient *in vitro* production of porcine blastocysts by handmade cloning with a combined electrical and chemical activation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, p. 1536-1545, 2005.

KRUIP, T. A. M.; DEN DAAS, J. H. G. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47, p. 43-52, 1997.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R. M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 62, p. 292-302, 2000.

KUBIAK, J. Z.; WEBER, M.; De PENNART, H.; WINSTON, J.; MARO, B. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. **EMBO J.**, Oxford, v. 12, p. 3773-3778, 1993.

KUPKER, W.; DIEDRICH, K.; EDWARDS, R. G. Principles of mammalian fertilization. **Hum. Reprod.**, Oxford, v. 13, p. 20-32, 1998.

LARKIN, K.; DANILCHIK, M. V. Microtubules are required for completion of cytokinesis in sea urchin eggs. **Dev. Biol.**, New York, v. 214, p. 215-226, 1999.

LATHAM, K. H. Epigenetic modification and imprinting of the mammalian genome during development. **Curr. Top. Dev. Biol.**, New York, v. 43, p. 1-49, 1999.

LEAL, C. L.; LEE, C.; MOOR, R. M. UV irradiation of pig metaphase chromosomes: maturation-promoting factor degradation, nuclear cytology and cell cycle progression. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 116, p. 363-371, 1999.

LEE, B. C.; KIM, M. K.; JANG, G.; OH, H. J.; YUDA, F.; KIM, H. J.; SHAMIM, M. H.; KIM, J. J.; KANG, S. K.; SCHATTEN, G.; HWANG, W. S. Dogs cloned from adult somatic cells. **Nature**, London, v. 436, p. 641, 2005.

LEE, J., MIYANO, T., MOOR, R. M. Spindle formation and dynamics of  $\lambda$ -tubulin and nuclear mitotic apparatus protein distribution during meiosis in pig and mouse oocytes. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 62, p. 1184-1192, 2000.

LI, G-P.; BUNCH, T. D.; WHITE, K. L.; ASTON, K. I.; MEERDO, L. N.; PATE, B. J.; SESSIONS, B. R. Development, chromosomal composition, and cell allocation of bovine cloned blastocyst derived from chemically assisted enucleation and cultured in conditioned media. **Mol. Reprod. Dev.** Cambridge, v. 68, p. 189-197, 2004.

LI, G-P.; LIU, Y.; BUNCH, T. D.; WHITE, K. L.; ASTON, K. I. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 71, p. 220-226, 2005.

LIU, J-L.; WANG, M-K.; SUN, Q-Y.; XU, Z.; CHEN, D-Y. Effect of telophase enucleation on bovine somatic nuclear transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 54, p. 989-998, 2000.

LIU, L.; JU, J-C.; YANG, X. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 59, p. 537-545, 1998.

LIU, L.; OLDEN BOURG, R.; TRIMARCHI, J. R.; KEEFE, D. L. A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. **Nat. Biotechnol.**, New York, v. 18, p. 223-225, 2000.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod. Domest. Anim.**, Berlin, v. 38, p. 259-267, 2003.

LUCIANO, A. M.; MODINA, S.; VASSENA, R.; MILANESI, E.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. Role of intracellular cyclic adenosine 3', 5' – monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 70, p. 465-472, 2004.

MARO, B.; JOHNSON, M. H.; PICKERING, S. J.; FLACH, G. Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, Cambridge, v. 81, p. 211-237, 1984.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microcirurgy and cell fusion. **Science**, Washington, v. 220, p. 1300-1302, 1983.

MEIRELLES, F. V.; CAETANO, A. R.; WATANABE, Y. F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S. F.; MERIGHE, G. K.; GARCIA, S. M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 82-83, p. 13-20, 2004.

MENG, L.; ELY, J. J.; STOUFFER, R. L.; WOLF, D. P. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 57, p. 454-459, 1997.

MÉO, S.C. **Ativação partenogenética e desenvolvimento embrionário inicial de oócitos bovinos tratados com estrôncio, ionomicina e 6-dimetilaminopurina.** 2002. 86 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHALL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 55, p. 89-95, 2000.

MINGOIA, Q. **Química farmacêutica.** São Paulo: Melhoramentos, 1967. 707p.

MOHAMED NOUR, M. S.; TAKAHASHI, Y. Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p. 661-666, 1999.

MOSES, R. M.; KLINE, D.; MASUI, Y. Maintenance of metaphase in colcemid-treated mouse eggs by distinct calcium-and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP)-sensitive mechanisms. **Dev. Biol.**, New York, v. 167, p. 329-337, 1995.

MOTLIK, J.; KOEFOED-JOHNSEN, H. H.; FULKA, J. Breakdown of germinal vesicle in bovine oocytes cultivated *in vitro*. **J. Exp. Zool.**, New York, v. 205, p. 377-384, 1978.

MUNSIE, M. Transgenic strategy for demonstrating nuclear reprogramming in the mouse. **Cloning Stem Cells**, Lanchmont, v. 4, p. 121-130, 2002.

OBACK, B.; WIERSEMA, A. T.; GAYNOR, P.; LAIBLE, G.; TUCKER, F. C.; OLIVER, J. E. Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. **Cloning Stem Cells**, Lanchmont, v. 5, p. 3-12, 2003.

ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; AKITA, T.; MIKAWA, S.; TAKEDA, K.; AWATA, T.; HANADA, H.; PERRY, A. C. F. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. **Science**, Washington, v. 289, p. 1188-1190, 2000.

OZIL, J. P.; MODLINSKI, J. A. Effect of electric field on fusion rate and survival of 2-cell rabbit embryos. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, Cambridge, v. 96, p. 211-228, 1986.

PEDERSEN, H. G.; SCHMIDT, M.; SANGILD, P. T.; STROBECH, L.; VAJTA, G.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Clinical experience with embryos produced by handmade cloning: work in progress. **Mol. Cell. Endocrinol.**, Amsterdam, v. 234, p. 137-143, 2005.

PERECIN, F.; SARAIVA, N. Z.; COSTA, P. F.; MÉO, S. C.; FERREIRA, C. R.; GARCIA, J. M. Chemical enucleation of bovine oocytes by topoisomerase inhibitors. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004, v. 2, p. 559.

PEURA, T. T.; LANE, M.H.; VAJTA, G.; TROUNSON, A.O. Cloning of bovine embryos from vitrified donor blastomeres. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 116, p. 95-101, 1999.

PEURA, T. T.; VAJTA, G. A comparison of established and new approaches in ovine and bovine nuclear transfer. **Cloning Stem Cells**, Lanchmont, v. 5, p. 257-277, 2003.

POLEJAEVA, I. A.; CHEN, S-H.; VAUGHT, T. D.; PAGE, R. L.; MULLINS, J.; BALL, S.; DAI, Y.; BOONE, J.; WALKER, S.; AYARES, D. L.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. S. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, London, v. 407, p. 505-509, 2000.

PRATHER, R. S.; BARNES, F. L.; SIMS, M. M.; ROBL, J. M.; EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Nuclear transfer in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 37, p. 859-866, 1987.

PRATHER, R. S.; KUBIAK, J.; MAUL, G. G.; FIRST, N. L.; SCHATTEN, G. The expression of nuclear lamin A and C epitopes is regulated by the developmental stage of the cytoplasm in mouse oocytes or embryos. **J. Exp. Zool.**, New York, v. 257, p. 110-114, 1991.

PRATHER, R. S.; SIMS, M. M.; FIRST, N. L. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 41, p. 414-419, 1989b.

PRATHER, R. S.; SIMS, M. M.; MAUL, G. G.; FIRST, N. L.; SCHATTEN, G. Nuclear laminin antigens are developmentally regulated during porcine and bovine early embryogenesis. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 41, p. 123-132, 1989a.

RAZ, T.; SKUTELSKY, E.; AMIHAI, D.; HAMMEL, I.; SHALGI, R. Mechanisms leading to cortical reaction in the mammalian egg. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 51, p. 295-303, 1998.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, Washington, v. 293, p. 1089-1093, 2001.

RENARD, J. P. Chromatin remodelling and nuclear reprogramming at the onset of embryonic development in mammals. **Reprod. Fert. Dev.**, East Melbourne, v. 10, p. 573-580, 1998.

RICHARD, F. J.; FOLTIER, M. A.; SIRARD, M. A. Role of the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in the control of meiotic resumption in bovine oocytes cultured with theca cell monolayers. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 56, p. 1363-1369, 1997.

RIDEOUT III, W. M.; EGGAN, K.; JAENISCH, R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. **Science**, Washington, v. 293, p. 1093-1098, 2001.

ROBL, J. M.; STICE, S. L. Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 31, p. 75-84, 1989.

RUSSEL, D. F.; IBÁÑEZ, E.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTROM, E. W. Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos *in vitro*, **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 72, p. 161-170, 2005.

SAEKI, K.; NAGAO, Y.; KISHI, M.; NAGAI, M. Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. **Theriogenology**, Stoneham, v. 48, p. 1161-1172, 1997.

SAVARD, C.; NOVAK, S.; SAINT-CYR, A.; MOREAU, M.; POTHIER, F.; SIRARD, M-A. Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 67, p. 70-76, 2004.



SIRACUSA, G.; WHITTINGHAM, D. G.; De FELICI, M. The effect of microtubules- and microfilament-disrupting drugs on preimplantation mouse embryos. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, Cambridge, v. 60, p. 71-82, 1980.

SIRARD, M. A.; FLORMAN, H. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; BARNES, F. L.; SIMS, M. L.; FIRST, N. L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 40, p. 1257-1268, 1989.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 1241-1254, 2001.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 126-136, 2006.

SMITH, L. C.; BORDIGNON, V.; BABKINE, M.; FECTEAU, G.; KEEFER, C. Benefits and problems with cloning animals. **Can. Vet. J.**, Guelph, v. 41, p. 919-924, 2000.

SMITH, L. C. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 99, p. 39-44, 1993.

SMITH, L. C.; WILMUT, I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 40, p. 1027-1035, 1989.

SPEEMANN, H. **Embryonic Development and Induction**. New Haven: Yale University Press, Conn., 1938.

STEIN, G. S.; BASERGA, R.; GIORDANO, A.; DENHARDT, D.T. **The molecular basis of cell cycle and growth control**. New York: Wiley-liss, 1999. 389p.

STICE, S.L.; ROBL, J.M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 39, p. 657-664, 1988.

STOJKOVIC, M.; BÜTTNER, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; RIEDL, J.; REICHENBACH, H.D.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; WOLF, E. Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long term culture: comparison of *in vivo* derived, *in vitro* produced, nuclear transfer and demi-embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 55, p. 151-162, 1999.

SUN, Q.Y.; LAI, L.X.; PARK, K.W.; DAY, B.N.; KUH HOLZER, B.; PRATHER, R.S.; SCHATTE N, H. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 64, p. 879-889, 2001.

SUN, Q. Y.; WU, G. M.; LAI, L.; PARK, K. W.; CABOT, R.; CHEONG, H. T. DAY, B. N.; PRATHER, R. S.; SCHATTE N, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, p. 155-163, 2001.

SUSS, U.; WUTRICH, K.; STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 38, p. 871-880, 1988.

SUTTON-McDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. *Cumulus* expansion and glucose utilization by bovine *cumulus*-oocyte complexes during *in vitro* maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. **Reproduction**, Cambridge, v. 128, p. 313-319, 2004.

SZOLLOSI, D.; CZOLOWSKA, R.; SZOLLOSI, M.S.; TARKOWSKI, A.K. Remodeling of mouse thymocyte nuclei depends on the time of their transfer into activated, homologous oocytes. **J. Cell Sci.**, London, v. 91, p. 603-613, 1988.

TANI, T.; TSUNODA, Y. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 64, p. 324-330, 2001.

TATHAM, B.G.; DOWSING, A.T.; TROUNSON, A.O. Enucleation by centrifugation of *in vitro*-matured bovine oocytes for use in nuclear transfer. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 53, p. 1088-1094, 1995.

TECIRLIOGLU, R. T.; FRENCH, A. J.; LEWIS, I. M.; VAJTA, G.; KORFIATIS, N. A.; HALL, V. J.; RUDDOCK, N. T.; COONEY, M. A.; TROUNSON, A. O. Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v. 15, p. 361-366, 2003.

TSUNODA, Y.; KATO, Y.; SHIODA, Y. Electrofusion for the pronuclear transplantation of mouse eggs. **Gamete Res.**, New York, v. 17, p. 15-20, 1987.

VAJTA, G.; BARTELS, P.; JOUBERT, J.; DE LA REY, M.; TREADWELL, R.; CALLESEN, H. Production of a healthy calf by somatic cell nuclear transfer without micromanipulators and carbon dioxide incubators using the handmade cloning (HMC) and submarine incubation system (SIS). **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, p. 1465-1472, 2004.

VAJTA, G.; LEWIS, I. M.; HYTTEL, P.; THOUAS, G. A.; TROUNSON, A. O. Somatic cell cloning without micromanipulators. **Cloning**, Lanchmont, v. 3, p. 89-95, 2001.

VAJTA, G.; LEWIS, I. M.; TROUNSON, A. O.; PURUP, S.; MADDOX-HYTTEL, P.; SCHMIDT, M.; PEDERSEN, H.G.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 68, p. 571-578, 2003.

VERDE, F.; DOGTEROM, M.; STELZER, E.; KARSENTI, E.; LEIBLER, S. Control of microtubule dynamics and length by cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. **J. Cell Biol.**, New York, v. 118, p. 1097-1108, 1992.

VERLHAC, M-H.; CÚBICA, J. Z.; CLARKE, H. J.; MARO, B. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. **Development**, Cambridge, v. 120, p. 1017-1025, 1994.

WAGONER, E. J.; ROSENKRANS, C. F.; GLIEDT, D. W.; PIERSON, J. N.; MUNYON, A. L. Functional enucleation of bovine oocytes: effects of centrifugation and ultraviolet light. **Theriogenology**, Stoneham, v. 46, p. 279-284, 1996.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C. F.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, London, v. 394, p. 369-374, 1998.

WANG, W-H.; ABEYDEERA, L. R.; PRATHER, R. S.; DAY, B. N. Polymerization of nonfilamentous actin into microfilaments is an important process for porcine oocyte maturation and early embryo development. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 62, p. 1177-1183, 2000.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 60, p. 996-1005, 1999.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R.; VIVANCO, W. H. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v. 10, p. 369-378, 1998.

WESSEL, G. M.; CONNER, S. D.; BERG, L. Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. **Development**, Cambridge, v. 129, p. 4315-4325, 2002.

WESTHUSIN, M. E.; COLLAS, P.; MAREK, D.; SULLIVAN, E.; STEPP, P.; PRYOR, J.; BARNES, F. Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality but not quantity of embryos produced by *in vitro* fertilization and nuclear transplantation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 46, p. 243-252, 1996.

WESTHUSIN, M. E.; LONG, C. R.; SHIN, T.; HILL, J. R.; LOONEY, C. R.; PRYOR, J. H.; PIEDRAHITA, J. A. Cloning to reproduce desired genotypes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 35-49, 2001.

WESTHUSIN, M. E.; PRYOR, J. H.; BONDIOLI, K. R. Nuclear transfer in the bovine embryo: a comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear transfer donor embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 28, p. 119-123, 1991.

WHEATLEY, S. P.; WANG, Y. Midzone microtubule bundles are continuously required for cytokinesis in cultured epithelial cells. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 135, p. 981-989, 1996.

WHITE, K. L.; YUE, C. Intracellular receptors and agents that induce activation in bovine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, p. 91-100, 1996.

WILLADSEN, S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, London, v. 320, p. 63-65, 1986.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; McWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, London, v. 385, p. 810-813, 1997.

WILSON, J. M.; WILLIAMS, J. D.; BONDIOLI, K. R.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; McCALLA, D. F. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 38, p. 73-83, 1995.

WINSTON, N. J.; McGUINNESS, O.; JOHNSON, M. H.; MARO, B. The exit of mouse oocytes from meiotic M-phase requires an intact spindle during intracellular calcium release. **J. Cell Sci.**, London, v. 108, p. 143-151, 1995.

WITTMANN, T.; HYMAN, A.; DESAI, A. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. **Nat. Cell Biol.**, London, v. 3, p. 28-34, 2001.

WOUDENBERG, A. R. B.; ZEINSTRA, E. C.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPF kinase activity: effect of estradiol supplementation and follicle size. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, 2005 (no prelo).

WRENZYCKI, C.; WELLS, D.; HERRMANN, D.; MILLER, A.; OLIVER, J.; TERVIT, R.; NIEMANN, H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 65, p. 309-317, 2001.

YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C. R.; MÉO, S. C.; LEAL, C. L. V.; MEIRELLES, F. V. GARCIA, J. M. Use of strontium in the activation of bovine oocytes reconstructed by somatic nuclear transfer. **Zygote**, New York, v. 13, p. 295-302, 2005.

YANG, X.; PRESICCE, G. A.; MORAGHAN, L.; JIANG, S.; FOOTE, R. H. Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 395-403, 1994.

YIN, X.J.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effect of enucleation procedures and maturation conditions on the development of nuclear-transferred rabbit oocytes receiving male fibroblast cells. **Reproduction**, Cambridge, v. 124, p. 41-47, 2002a.

YIN, X.J.; TANI, T.; YONEMURA, I.; KAWAKAMI, M.; MIYAMOTO, K.; HASEGAWA, R.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 67, p. 442-446, 2002b.

YONG, Z.; YUQIANG, L. Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: production of goats by serially cloning embryos. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 58, p. 266-269, 1998.

ZAKHARTCHENKO, V.; STOJKOVIC, M.; BREM, G.; WOLF, E. Karyoplast-cytoplasm volume ratio in bovine nuclear transfer embryos: effect on developmental potential. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 48, p. 332-338, 1997.