

EDUARDO MONTANARI RAZZA

PRODUÇÃO DE QUIMERAS EMBRIONÁRIAS BOVINAS MEDIANTE
A AGREGAÇÃO DE EMBRIÕES DIPLOIDES (*Bos taurus*) E
TETRAPLOIDES (*Bos indicus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

BOTUCATU - SP

2011

Razza, Eduardo Montanari.

Produção de quimeras embrionárias bovinas mediante a agregação de embriões diplóides (*Bos taurus*) e tetraplóides (*Bos indicus*) /Eduardo Montanari Razza - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2011.

Orientador: Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

Capes: 20602006

1. Animais domésticos - Doenças - Diagnóstico. 2. Ultra-sonografia veterinária.

Palavras-chave: Agregação; Bovino; Eletrofusão; Quimerismo; Tetraplóide

Dedicatória

A meus pais, por se absterem de coisas que eu jamais saberei em prol do meu crescimento, por me propiciar uma vida muito mais fácil que a deles próprios e pelo irrestrito amor e apoio em mim depositados em todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, Santo Expedito, Anjo da Guarda e demais entidades metafísicas às quais recorri indiscriminadamente ao longo da pós-graduação;

Especialmente ao meu orientador, Professor Dr. Marcelo F. G. Nogueira, profissional ético e dedicado, pesquisador criativo e detentor de um conhecimento a frente do seu tempo. Agradeço por confiar a mim desafios científicos e por me conduzir com firmeza e competência nas minhas oscilações acadêmicas;

Ao querido Professor Dr. Ciro Moraes Barros, pela ótima recepção e estadia em seu laboratório, agradeço pelo incentivo, pela orientação, pelo apoio e por compartilhar um pouco de sua vasta experiência científica;

A meu irmão Bruno, por ser um irmão que eu escolheria para ter caso já não o fosse e por ter sido minha primeira referência intelectual que certamente foi contundente na formação da minha capacidade crítica;

Aos meus amigos Renato, Thaís, Leonardo, Danilo, Diego, Walter, Mariana, Anthony, Antônio Guilherme, Bruno, José Renato, Fernanda, Carol, Vinícius e Raquel. Em especial aos amigos Rafael, Isabele, Cíntia, Bruna, Janahi, Rafaela e Patrícia que direta ou indiretamente colaboraram para este trabalho. Aos amigos de pós-graduação Cícília, Guta, Celso, Ronaldo, Marcelo, Ester, Rúbia, Felipe, Paula, Bárbara, Maurício, Leo, Ana e demais não citados, mas da mesma forma importantes;

Ao meu grande amigo Rafael Satrapa, que primeiro me acolheu na prática da pesquisa, me ensinado quase tudo que aprendi. Agradeço por ser para mim um grande exemplo de competência e dignidade, no qual me espelhei. Agradeço pela cumplicidade e amizade em todos os momentos destes últimos anos e tenho certeza que estaremos juntos nos próximos que ainda virão;

À Professora Fernanda Cruz Landin e Alvarenga por ceder gentilmente o Eletrofusor e Multiporador Eppendorf na fase inicial do projeto;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia: Cris, Janete, Luiz e Paulo pela boa amizade e pela convivência agradável;

À FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho;

MUITO OBRIGADO!

Epígrafe

Seja a mudança que você deseja ver no mundo.

Mahatma Gandhi

Sumário

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Capítulo 1	pag. 14
Resumo e <i>Abstract</i>	pag. 15
Introdução	pag. 20
Hipótese e Objetivos	pag. 25
Revisão de Literatura	pag. 27
Referências Bibliográficas	pag. 43
Capítulo 2	pag. 52
Resumo.....	pag. 54
Contexto.....	pag. 56
Material e Métodos.....	pag. 58
Resultados	pag. 64
Discussão	pag. 68
Conclusão	pag. 71
Referências Bibliográficas	pag. 73
Considerações Finais.....	pag. 81

Lista de Abreviaturas

2n – diploide(s)

4n – tetraploide(s)

BSA - albumina sérica bovina

CGE – Célula germinativa embrionária

CO₂ - gás carbônico

COCs - (*cumulus oocytes complexes*): complexo *cumulus*-oócito

CTE - Células tronco embrionárias

DNA – (Deoxyribonucleic acid): ácido desoxirribonucleico

FSH - hormônio folículo estimulante

g - Força gravitacional

G - Gauge (unidade de medida de calibre)

GFP – Green fluorescent protein

hpi - horas pós-inseminação

kV/cm – Quilovolts por centímetro

LH - hormônio luteinizante

MCI – Massa celular interna

mg – miligrama

mL - mililitro

mM - milimolar

N₂ - nitrogênio

NaCl - cloreto de sódio

O₂ - oxigênio

PCR – (Polymerase chain reaction): reação em cadeia da polimerase

PHE - Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina

PIV - produção *in vitro*

rpm - rotações por minuto

SOF - (synthetic oviduct fluid): fluido sintético de oviduto

TCM - (tissue culture medium): meio para cultivo tecidual

UI – unidade(s) internacional(is)

V – Volt(s)

µg – micrograma

µL - microlitro

µs - microssegundo

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Ilustração esquemática das técnicas de quimerismo embrionário. A) Agregação entre dois embriões de 8 células; B) Cocultivo de um embrião de 8 células com células tronco embrionárias; C) “Sanduíche” de células tronco embrionárias entre dois embriões de 8 células; D) Microinjeção de células tronco embrionárias na blastocele de um embrião receptor.....Pág. 34

Figura 2. A) Bezerro quimérico nascido a partir da agregação de um embrião partenogênético com um embrião PIV. A seta indica um padrão avermelhado oriundo do embrião partenogênético. B) Bezerro quimérico nascido a partir da agregação de um embrião partenogênético com 2 embriões PIV. A seta indica um padrão avermelhado oriundo do embri.....Pág. 36

Figura 3. Bezerros quiméricos derivados da agregação de células semelhantes às CTE com embriões tetraploides (IWASAKI *et al.*, 2.....Pág. 40

Capítulo 2

Fig. 1. Imagens ilustrativas do contato realizado em um par de embriões sem zona pelúcida, em estágio de desenvolvimento de 8 células e dentro de um poço para agregação do tipo “WOW” e de blastocistos expandidos quiméricos bovinos.....Pág. 63

Fig. 2. Imagens ilustrativas de blastocistos tetraploides bovinos, iniciais e expandidos, produzidos após eletro fusão com a voltagem de 0,75 kV/cm por 60 μ s.....Pág. 65

Fig. 3. A) Embriões, *Bos indicus* e produzidos *in vitro*, de duas células antes do protocolo de eletro fusão. O eixo interblastômeros é evidente na maioria deles. B) Os mesmos embriões, mostrados em A, após a emissão do eletrochoque e já fundidos ou em processo de fusão, em sua maioria, visível devido à perda do eixo interblastômeros.....Pág. 66

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1. Diferentes parâmetros testados, para a emissão do pulso elétrico, na tentativa de eletrofusão de embriões bovinos com 2 células, produzidos *in vitro* e da raça Nelore, bem como suas respectivas taxas de fusão e de clivagem pós-fusão..... Pág. 65

Tabela 2. Pares de embriões utilizados, taxa de agregação destes pares e taxa de formação de blastocistos quiméricos dos grupos controle quimera (*Bos indicus*, 2n) e experimental quimera [mestiço *B. taurus* (2n) com *B. indicus* (4n)].....Pág. 67

Capítulo 1

Resumo e Abstract

Introdução

Hipótese e Objetivos

Revisão da Literatura

Referências Bibliográficas

Resumo e Abstract

Produção de quimeras embrionárias bovinas mediante a agregação de embriões diploides (*Bos taurus*) e tetraploides (*Bos indicus*)

RESUMO

No quimerismo por agregação, células de embriões oriundos de fertilizações distintas se distribuem, aleatoriamente, para formar um único indivíduo. Entretanto, a formação de embriões tetraploides (4n), por eletrofusão, e o posterior quimerismo com um embrião diploide (2n) deve resultar em um embrião quimérico, porém com massa celular interna (MCI) não aleatória, isto é, exclusivamente 2n. Desta forma, a agregação de um embrião zebuino (4n, genótipo termorresistente) com um taurino (2n, genótipo termosensível) resultaria em uma MCI exclusivamente "taurina", porém com o trofotoderma (futuro elemento extraembrionário, isto é, o córion) de maior composição zebuína, podendo constituir um modelo para estudos de adaptação - durante a gestação - deste embrião/feto em clima tropical. O objetivo do presente trabalho foi padronizar a produção de embriões 4n da raça Nelore (*Bos indicus*) bem como o quimerismo por agregação com embriões mestiço *Bos taurus* (2n) com *Bos indicus* (4n). Oócitos de vacas Nelore provenientes de abatedouro foram maturados, fertilizados com sêmen de touros Nelore ou Holandês Preto e Branco e cultivados em meio SOF. Embriões da raça Nelore, em estágio de 2 células (30 h pós-inseminação, hpi) e com o eixo interblastômeros bem definido, foram selecionados para o procedimento de eletrofusão (equipamento ECM 830-BTX, Harvard Apparatus) com o intuito de produzir embriões tetraploides. Para este procedimento, foram testados alguns parâmetros, de acordo com o número de pulsos (1 ou 2), voltagem (0,40; 0,50; 0,75; 1,0; 1,4; 5,0 kV/cm) e duração do

eletrochoque (20; 25; 50; 60 μ s). Embriões zebuínos 4n, formados após a eletrofusão, e embriões mestiços taurinos 2n, ambos em estágio de 8 a 16 células (72 hpi), foram submetidos a tratamentos com protease (Pronase[®]) para remoção da zona pelúcida e posteriormente com agente aglutinador (fitohemaglutinina). Embriões *Bos indicus* (4n) e mestiços *Bos taurus* (2n) foram agregados aos pares (4n+2n) e cultivados até o estágio de blastocisto em poços individuais para a formação de quimeras embrionárias. Dentre os parâmetros testados, os melhores resultados de fusão (93%) e de clivagem pós-fusão (71%) foram obtidos com um pulso único de 75 V, por 60 μ s. A produção de blastocistos expandidos 4n foi de 43%, com a utilização destes parâmetros. Após quatro replicatas, 4 quimeras embrionárias (13%; 4/31) foram produzidas e desenvolveram-se até o estágio de blastocisto. A validação desse modelo [*Bos indicus* (4n)+*Bos taurus* (2n)], com padrão não aleatório de distribuição das células agregadas, pode permitir a sua utilização em pesquisas aplicadas com a geração de bezerros exclusivamente taurinos, mas com elementos placentários de *B. indicus*, uma vez que sejam estabelecidas gestações viáveis e à termo.

Aggregation of diploid (*Bos taurus*) and tetraploid embryos (*Bos indicus*) to produce bovine embryonic chimeras

ABSTRACT

The embryonic chimeras production by aggregation allows embryonic cells from two distinct fertilizations to be randomly distributed to compose a single individual. However, the formation of tetraploid embryo (4n) by electrofusion and its subsequent chimerism with a diploid embryo (2n) should result in a chimeric conceptus, whose inner cell mass (ICM) would be entirely 2n. Hence, the aggregation of a zebu embryo (4n, thermotolerant) with a European breed embryo (2n, thermosensitive or “taurine”) would result in an exclusively taurine ICM, but the trophectoderm (future extraembryonic components, *i.e.* chorion) would be mostly from zebu embryo, which could support taurine embryo/fetus in a different way - during pregnancy - under tropical environment. The aim of this study was to standardize the production of 4n Nelore embryos (*Bos indicus*) and the production of embryonic chimeras by aggregation of crossbred *Bos taurus* (2n) with *Bos indicus* (4n) embryos. Nelore cows ovaries were collected from abattoir and oocytes were obtained, matured, fertilized with semen from Nelore or Holstein bulls, and cultured in SOF (synthetic oviduct fluid). Two-cell stage Nelore embryos (30 hours post insemination or hpi), with a clearly visible interblastomeric axis, were selected for electrofusion procedure (ECM 830-BTX, Harvard Apparatus) to produce tetraploid embryos. For this purpose, some parameters were tested according to the number of pulses (1 or 2), voltage (40, 50, 75, 100, 140, 500 V) and time length of electroshock (20, 25, 50, 60 μ s). Nelore tetraploid embryos

produced after electrofusion and diploid crossbred taurine embryos, both on 8 to 16-cells stage (72 hpi) were subjected to protease treatment to remove the zona pellucida, and subsequently treated with the agglutinant agent phytohemagglutinin. *Bos indicus* (4n) and crossbred *Bos taurus* (2n) embryos were put in close contact in pairs (4n+2n) into individual wells for *in vitro* culture until the blastocyst stage to validate the chimeric embryo production. Among the evaluated parameters, the best results to fusion (93%) and post-fusion cleavage rates (71%) were obtained with a single pulse of 75 V during 60 μ s. The production rate of expanded 4n blastocysts was 43% with those parameters. After four replicates (n=31 attempts) 4 embryonic chimeras 4n+2n (13%) were developed until the blastocyst formation. The production of bovine embryonic chimeras [*Bos indicus* (4n) + *Bos taurus* (2n)], with a non-random pattern of distribution of their aggregated cells, may enable the validation of this technique in applied research, by producing exclusively taurine calves, but with placental elements from *Bos indicus* breed, after viable and full term pregnancy establishment.

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

Há tempos a miscigenação de células oriundas de dois ou mais genitores paternos e maternos tem sido estudada como ferramenta para o entendimento de conceitos da embriogênese, organogênese, imunologia e da capacidade em gerar tipos celulares especializados e oriundos dos três folhetos embrionários, isto é, a pluripotência. A esta técnica deu-se o nome de quimerismo embrionário (BARNES, 1976; TARKOWSKI, 1998; NAGY *et al.*, 2003).

É bem conhecida a viabilidade das técnicas de produção de quimeras embrionárias, principalmente em murinos, bem como sua contribuição acerca das descobertas no âmbito da embriogênese e organogênese de mamíferos. (NAGY *et al.*, 2003). Da mesma forma, o avanço da técnica do quimerismo embrionário tem fornecido subsídios científicos para a comprovação *in vivo* da pluripotência de células tronco embrionárias (CTE), oriundas da massa celular interna (MCI; JIA *et al.*, 2008), além de gerar ferramentas importantes para avaliações (*in vivo*) mais compreensíveis e eficientes das características das células tronco dos tecidos embrionários e adultos, tanto de camundongos quanto de outras espécies de mamíferos (TAM & ROSSANT, 2003).

Na produção de embriões quiméricos, uma possibilidade seria a manipulação da relação entre as populações celulares da MCI do embrião receptor e da MCI oriunda de um embrião com genótipo diferenciado (em termos comerciais), com o intuito de aumentar - ou mesmo repor integralmente - a participação da MCI deste último genótipo na linhagem das células sexuais.

Outro conceito difundido na biotecnologia da produção de embriões é o da tetraploidia embrionária. Esta técnica produz seus melhores resultados a partir da eletrofusão de embriões em estágio de duas células e com um eixo interblastomérico bem definido, o que resulta em um embrião tetraploide (4n) com competência para se desenvolver até estágios avançados, mas não a termo (BERG, 1982; KUBIAK & TARKOWSKI, 1985).

Uma estratégia de produção de quimeras cooptou a capacidade de embriões tetraploides comporem os anexos embrionários (o córion da placenta), uma vez que este tipo celular não segue um padrão aleatório de distribuição no concepto. Células 4n raramente constituem o embrião em si, contribuindo quase que exclusivamente na formação de elementos extraembrionários, devido à necessidade da euploidia para o correto funcionamento das células somáticas e dos tecidos como um todo (EVERETT & WEST, 1996, 1998).

Essa particularidade permite que tais células sejam utilizadas na indução de quimerismo embrionário em que, mais tardiamente no desenvolvimento, o feto seria constituído por células diplóides (2n) e a placenta conteria aquelas 4n, compondo então, um concepto quimérico no qual o feto em si não conteria significativamente genótipo oriundo do embrião 4n.

Pesquisas acerca da agregação de embriões 2n e 4n permitem uma melhor caracterização dos eventos que coordenam, como um todo, o potencial de desenvolvimento das CTE murinas, visto o comprometimento destas em constituir o tecido fetal. Na área de reprodução animal, uma aplicabilidade destes conceitos seria a produção de embriões bovinos quiméricos, cujo genótipo 2n consistiria no

animal de interesse reprodutivo com algum grau de comprometimento (produzidos *in vitro*, sensíveis ao estresse térmico calórico, baixa qualidade ou oriundo de clonagem por transferência nuclear de célula somática), enquanto o genótipo 4n seria composto por uma linhagem com algum fenótipo desejado, que não o feto em si (maior adaptabilidade ou termorresistência) ou ainda com maior viabilidade celular (p. ex., produzida *in vivo*).

Embriões produzidos *in vitro* são, muitas vezes, referidos por produzirem taxas subótimas de gestação e de parição de neonatos saudáveis, provavelmente devido ao meio em que são cultivados enquanto, por outro lado, embriões produzidos *in vivo* são mais eficientes nesses quesitos (LONERGAN & FAIR, 2008). Portanto, esse mecanismo, hipoteticamente, poderia ser uma ferramenta de estudo visando aumentar a eficácia do estabelecimento e da gestação a termo, de embriões com algum grau de comprometimento. Foi descrito que uma taxa significativa da mortalidade de embriões produzidos *in vitro* ocorre por defeitos na placentação (FARIN *et al.*, 2006) e tais defeitos também foram atribuídos às falhas nas gestações de embriões bovinos clonados (MEIRELLES *et al.*, 2010).

No contexto de embriões quiméricos 2n/4n, teoricamente, embora o conceito possa ser chamado de quimérico, o embrião em si (epiblasto) seria oriundo somente do genótipo 2n, enquanto o trofotoderma seria preferencialmente 4n.

Ilustrativamente, em uma abordagem mais prática, os efeitos do estresse térmico calórico (ETC) sobre a viabilidade do embrião são bem conhecidos (EDWARDS *et al.*, 2001). Embriões da raça Nelore (*Bos indicus*) são mais resistentes ao ETC que embriões originários de raça europeia (p. ex., Holandesa

preta e branca; *Bos taurus*) nos estágios iniciais de desenvolvimento (MONTEIRO *et al.*, 2009). Dessa forma, poderia ser aventado que embriões quiméricos compostos por diploidia de animais europeus (mais sensíveis) e tetraploidia de animais Nelore (mais resistentes) poderiam, eventualmente, mostrar um fenótipo mais adaptado às condições do ambiente subtropical, principalmente durante o reconhecimento materno da gestação. O estudo de tal evento seria interessante, quer pelo potencial econômico de sua aplicação quer pelo conhecimento sobre a complementação funcional do conceito oriundo de genótipos distintos, com relação à termotolerância.

Hipótese e Objetivos

2 - HIPÓTESE

A agregação de embriões tetraploides (da raça Nelore; *Bos indicus*) e diploides (sêmen da raça Holandesa preta e branca - *Bos taurus* - e oócitos da raça Nelore) produz quimeras bovinas com desenvolvimento *in vitro* - e formação de blastocistos expandidos - semelhante aos embriões produzidos *in vitro* oriundos da raça Nelore.

3 - OBJETIVOS

3.1. GERAIS

- i) Validar, na espécie bovina e nas condições do laboratório no qual o experimento foi realizado, a técnica do quimerismo por agregação de embriões tetraploides (produzidos por eletrofusão) com diploides, ambos produzidos *in vitro*;
- ii) Avaliar a taxa de formação de blastocistos quiméricos expandidos, produzidos *in vitro*, em relação ao desenvolvimento de embriões controle PIV.

3.2. ESPECÍFICOS

- i) Analisar, caso haja quimeras produzidas em quantidade suficiente para tal, o destino dos diferentes tipos celulares (tetraploide e diploide) nos blastocistos quiméricos produzidos *in vitro*;
- ii) Analisar, caso haja quimeras produzidas em quantidade suficiente para tal, a taxa de gestação dos blastocistos quiméricos produzidos *in vitro*.

Revisão da Literatura

4 - REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Definição de quimerismo

O conceito de quimerismo foi introduzido com a mitologia grega, na figura da Quimera, uma fera com cabeça de leão, corpo de cabra e cauda de serpente. Apesar de, na ciência moderna, a quimera não ser esse monstro, ela mantém o conceito mitológico da mistura de células de mais de uma origem, sem perda de sua identidade, em um único ser (ROSSANT *et al.*, 1982).

Assim, a quimera embrionária é, por definição, um ser cujas células são derivadas de mais de um embrião, isto é, de mais de uma fertilização. Desse modo, cada célula da quimera retém sua identidade genotípica e sua distribuição é aleatória, no animal resultante. Logo, por consequência da definição, o quimerismo não é hereditário, pois as células germinativas mantêm sua identidade e produzem gametas com identidades não quiméricas e exclusivamente de uma de suas várias origens celulares. Assim, as quimeras embrionárias diferem, biologicamente, dos híbridos, dos mosaicos e dos transgênicos e devem ser criadas experimentalmente, não podendo ser produzidas pelo acasalamento de animais quiméricos (NAGY *et al.*, 2003; LOW-ZEDDIES & TAKAHASHI, 2005).

Existem diversos tipos de quimerismo, quais sejam: *i*) quimerismo embrionário - ocorre quando um embrião é formado a partir de dois ou mais embriões originais, contendo conjuntos completos de cromossomos de pelo menos dois pais e de duas mães; *ii*) quimerismo tecidual - existe quando um ser tem tecidos de duas, ou mais, origens embrionárias caso, por exemplo, de

indivíduos submetidos ao transplantes de órgãos; *iii*) quimerismo celular - caracteriza-se quando há a transferência do núcleo de uma célula para outra enucleada, a qual terá, então, um DNA nuclear de origem diferente do DNA mitocondrial (por exemplo, a clonagem pela técnica de transferência nuclear de células somáticas); e *iv*) quimerismo genético - estabelecido quando uma molécula de DNA recebe a inserção de uma sequência genética, de origem diferente da sua, caso, por exemplo, dos indivíduos transgênicos (TARKOWSKI, 1998).

4.2. Técnicas para realizar o quimerismo embrionário

As técnicas de quimerismo embrionário foram primeiramente padronizadas e estabelecidas em espécies murinas (ratos e camundongos) e, posteriormente, algumas delas foram transferidas para experimentações na espécie bovina. Dentre as técnicas de quimerismo já realizadas, as mais difundidas são a agregação de embriões por proximidade; o cocultivo com CTE; e a microinjeção (LEE *et al.*, 2007).

4.2.1. Técnica de agregação por proximidade

A primeira quimera embrionária murina, viável e a termo, foi criada em 1961, por Andrzej Tarkowski mediante a agregação por proximidade de dois embriões diploides e em fase de desenvolvimento embrionário de oito células (TAM & ROSSANT, 2003). Esta técnica foi, posteriormente, aperfeiçoada por outros autores, mediante a remoção não mecânica da zona pelúcida - pelo uso da

pronase ou da solução ácida de Tyrode - e/ou introduzindo a fitohemaglutinina como molécula de adesão (revisto por TARKOWSKI, 1998).

O quimerismo por agregação apresenta as vantagens de permitir a agregação de embriões em diversas fases do desenvolvimento, com diferentes ploidias, além de, pelo mesmo princípio, permitir a agregação de embriões ($2n$ ou $4n$) com CTE ou células trofectodérmicas, necessitando, para isso, de poucos recursos físicos se comparada a outras técnicas de quimerismo (NAGY *et al.*, 2003; MACKAY & WEST, 2005; Fig. 1).

A quimera embrionária construída por agregação foi extensivamente estudada após a sua padronização e ganhou outros enfoques além do inicial como, por exemplo, o de analisar fenótipos celulares mutantes (ROSSANT & SPENCE, 1998). Nesse caso, embriões $2n$ mutantes e heterozigotos são agregados com embriões $2n$ não mutantes, ou com CTE, para analisar o comportamento das células na presença umas das outras. Essa é uma abordagem muito importante sobre a natureza autônoma ou não autônoma da célula sobre um fenótipo mutante (NAGY *et al.*, 2003).

Usualmente, os estágios embrionários utilizados para a agregação de embriões são aqueles compreendidos entre 8 células e mórulas, ou seja, estágios de desenvolvimento mais iniciais. Nesses estágios, nenhuma célula está comprometida, em definitivo, com as futuras linhagens celulares podendo, assim, contribuir tanto para a MCI como para o trofectoderma. Desse modo, as células do embrião - nesses estágios iniciais do desenvolvimento - são passíveis de serem classificadas como morfologicamente totipotentes (LU & MARKERT, 1980). Adicionalmente, nestes estágios o embrião sintetiza moléculas de adesão celular,

como a uvomorulina (E-caderina) presente nos desmossomos, o que aumenta as chances de agregação entre os embriões (SAKKAS & VASSALLI, 2008).

Entretanto, quimeras também podem ser produzidas mediante a agregação de embriões em fases mais avançadas do desenvolvimento, dependendo do objetivo do estudo. As células da MCI de um blastocisto podem ser utilizadas para agregação com embriões de 8 células ou com mórulas, embora elas possam contribuir, exclusivamente, para a formação do epiblasto e do hipoblasto - mas não formará o trofotoderma, devido ao comprometimento celular já estabelecido (TAM & ROSSANT, 2003).

Entende-se que quimerismo por agregação também seja a agregação de dois embriões (2n ou 4n) com CTE. Nesse caso, um “sanduíche” com as CTE, de modo que elas sejam flanqueadas, e estejam em contato, com dois embriões de 8 células (WOOD *et al.*, 1993; Fig. 1-C). Este método foi desenvolvido por Stewart, em 1980, e se tornou bastante popular posteriormente (TARKOWSKI, 1998) por ser tão eficiente quanto à técnica de microinjeção, com a vantagem de dispensar equipamentos sofisticados.

4.2.2. Técnica de cocultivo de embriões com células tronco embrionárias

Essa técnica é, basicamente, o cocultivo de embriões de 8 células (sem zona pelúcida) sobre CTE (Fig. 1-B). Para isso, as CTE são cultivadas normalmente formando uma camada de células na placa (ou tubo) de cultivo. Os embriões, sem zona pelúcida, são depositados sobre essa camada de CTE e permanecem em contato durante o período de cultivo *in vitro*, seguindo os mesmos princípios gerais

daqueles descritos para a agregação de embriões em estágio preimplantacional (WOOD *et al.*, 1993).

A diferenciação *in vivo* das CTE, após a agregação, procederá de maneira normal e organizada, com estas colonizando os três folhetos embrionários: o ectoderma, o endoderma e o mesoderma (WELLS, 2002). Contudo, devido ao fato de as CTE já estarem com sua linhagem comprometida (pela sua origem da MCI) e por apresentarem diâmetro reduzido, se comparado com o de um embrião de 8 células, as CTE colonizarão, majoritariamente, o feto.

Desse modo, segundo essa técnica de quimerismo, o feto é completamente quimérico, assim como o conceito. Entretanto, embora mais simples, este método produziu quimerismo com uma menor eficácia, quando comparado com a microinjeção de CTE e com a técnica de “sanduíche” de embriões com CTE (LEE *et al.*, 2007).

IWASAKI *et al.* (2000b) mostraram que, enquanto 60% dos fetos oriundos do cocultivo entre embriões murinos diploides e CTE fluorescentes verdes (*Green Fluorescent Protein - GFP*) eram quiméricos, 100% dos fetos eram derivados das CTE GFP quando foram utilizados embriões tetraploides no cocultivo. Esses resultados corroboraram que as CTE são capazes de contribuir no desenvolvimento de todas as linhagens usualmente derivadas da MCI, incluindo as células germinativas primordiais.

4.2.3. Técnica de microinjeção de células

A microinjeção é o método mais utilizado para se construir quimeras de embriões com CTE, embora outros tipos celulares também possam ser injetados, como células teratocarcinogênicas e células germinativas embrionárias (CGEs). Entretanto, a injeção de CTE constitui-se no tipo celular padrão utilizado para essa técnica de quimerismo (TARKOWSKI, 1998).

As células podem ser injetadas na cavidade da blastocele (blastocisto) ou no espaço perivitelino (embrião de 4 a 8 células; LEE *et al.*, 2007; Fig. 1-D). Esta técnica foi empregada pela primeira vez em 1968 por Richard L. Gardner, que isolou células de um embrião murino e as injetou na blastocele (*apud* OLIVEIRA-DOS-SANTOS, 1999).

Valendo-se da mesma técnica, PESQUERO *et al.* (2007) utilizaram-na em blastocistos de camundongos. Os autores isolaram CTE e injetaram-nas em embriões receptores, produzindo camundongos quiméricos. Eles corroboraram a pluripotência das células tronco oriundas da MCI e que essas células foram capazes de diferenciarem-se *in vivo* de forma normal e organizada, produzindo um indivíduo completo (PESQUERO *et al.*, 2007).

De modo semelhante, mas em coelhos, GILES *et al.* (1993) isolaram células da MCI e as cultivaram como CTE. Eles injetaram as células no espaço perivitelino (mórulas) ou na blastocele, gerando 86% e 31% de animais nascidos, respectivamente.

JIA *et al.* (2008), aplicando a mesma técnica, produziram uma quimera caprina ao injetar CGEs - isoladas da crista gonadal de fetos de cabra de pelagem

branca - na blastocele de embriões caprinos com fenótipo para pelagem escura. Os blastocistos foram inovulados em receptoras, das quais uma pariu três filhotes: um macho, uma fêmea, e um natimorto, com malformação e gênero indeterminado. A fêmea e o natimorto nasceram com pelagem preta e com uma grande mancha branca na cabeça. Avaliações por PCR e DNA microssatélite mostraram que estes eram gêmeos monozigóticos e quiméricos. Esse estudo concluiu que as CGEs puderam diferenciar-se em células dos três folhetos embrionários *in vivo* (JIA *et al.*, 2008).

ROSSANT & FRELS (1980) utilizaram esta mesma técnica para produzir a primeira quimera de mamíferos, nascida viva, entre espécies que não se acasalam normalmente, isto é, o *Mus musculus* e o *Mus caroli*.

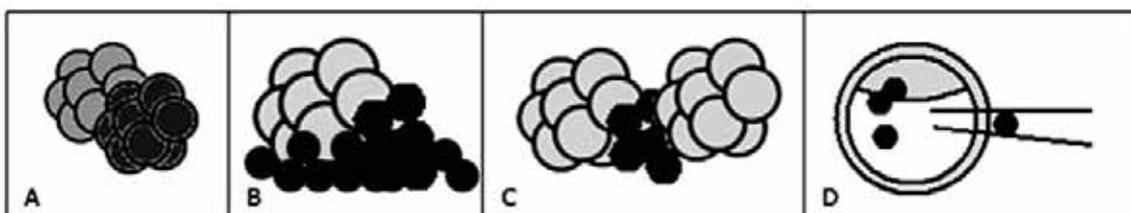


Figura 1. Ilustração esquemática das técnicas de quimerismo embrionário. A) Agregação entre dois embriões de 8 células (diploides, $2n$, ou tetraploides, $4n$); B) Cocultivo de um embrião de 8 células ($2n$ ou $4n$) com células tronco embrionárias (com diâmetro celular menor); C) "Sanduíche" de células tronco embrionárias entre dois embriões de 8 células ($2n$ ou $4n$); D) Microinjeção de células tronco embrionárias na blastocele de um embrião receptor (DRAPER & NAGY, 2007).

Desse modo, o método de microinjeção de CTE na blastocele é bastante eficiente, entretanto, a microinjeção requer equipamentos e ferramentas para tal (micromanipulador, microscópio invertido, micropipetas etc) que são bastante

caros, além de demandar considerável tempo para a aquisição de habilidade pelo operador (WOOD *et al.*, 1993). Além disso, esse método não permite a execução de mais do que 20 a 40 blastocistos por hora, nem mais que 50 a 100 blastocistos por dia (LEE *et al.*, 2007).

4.3. Quimerismo em bovinos

WILLIANS *et al.* (1990) obtiveram sucesso ao produzir bezerros quiméricos interespecíficos. Para tanto, colheram embriões produzidos *in vivo* de *Bos indicus* (Brahman) e *Bos taurus* (Friesan e Hereford), bipartiram e inseriram os hemiembrões produzidos aos pares (*Bos indicus*+*Bos taurus*) dentro de uma mesma zona pelúcida e foram inovulados. Embora seja desnecessária a reinserção dos agregados quiméricos em zonas pelúcidas, das 112 quimeras inovuladas, 15 geraram bezerros quiméricos interespecíficos.

A indução de quimerismo embrionário, em bovinos, também foi relatada em embriões partenogênicos com BOEDIONO *et al.* (1999). Este experimento permitiu aferir que o agregado quimérico de blastômeros oriundos da produção *in vitro* (PIV) com blastômeros partenogênicos foi competente para desenvolver-se a termo e, além disso, foi possível verificar o sucesso do quimerismo no fenótipo dos bezerros nascidos (Fig. 2).

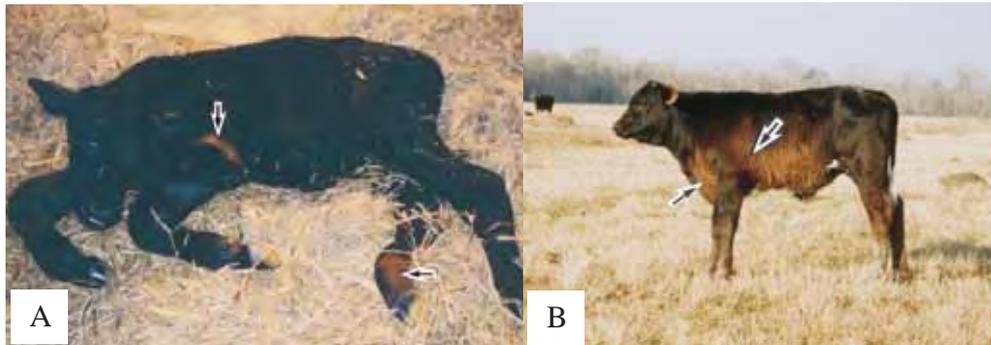


Figura 2. A) Bezerro quimérico nascido a partir da agregação de um embrião partenogenético com um embrião PIV. A seta indica um padrão avermelhado oriundo do embrião partenogenético. B) Bezerro quimérico nascido a partir da agregação de um embrião partenogenético com 2 embriões PIV. A seta indica um padrão avermelhado oriundo do embrião partenogenético (BOEDIONO *et al.*, 1999).

Adicionalmente, outros experimentos com o uso das técnicas de quimerismo embrionário foram realizados com embriões de diferentes sexos. Blastômeros foram marcados com PKH26-GL, para verificar se o sexo embrionário afetaria as taxas de desenvolvimento de embriões reconstruídos no estágio de 4 células (RHO *et al.*, 2001), porém os resultados não confirmaram tal hipótese.

A produção de blastocistos quiméricos, por meio da microinjeção de células semelhantes às CTE em blastocistos bovinos PIV, foi relatada com sucesso (WOLF *et al.*, 2004). Esta técnica, além de proporcionar avanços na produção de bovinos transgênicos, permite a validação eficaz da pluripotência das CTE utilizadas.

4.4. Padrão não aleatório de distribuição celular no quimerismo

Quando dois embriões $2n$, com 2 a 8 blastômeros, são agregados o quimerismo pode ocorrer tanto no epiblasto como no hipoblasto ou no trofotoderma. No entanto, quando células oriundas da MCI de embriões compactados são utilizadas para a produção de quimeras - quer pela microinjeção, em mórula ou blastocisto, quer pela agregação com embriões de 8 células ($2n$) - elas irão apenas contribuir para a formação do epiblasto e do hipoblasto, mas não do trofotoderma. Esta restrição da MCI reflete o seu comprometimento com linhagens celulares que não a trofotodérmica (WOLPERT, 2008).

As CTE apresentam uma contribuição semelhante, uma vez que elas são originadas da própria MCI. As CTE se diferenciam, geralmente, em linhagens celulares competentes para todos os tipos de tecidos embrionários e alguns extraembrionários (dentre eles o âmnio, o mesoderma e o endoderma do saco vitelino, o alantoide e alguns vasos sanguíneos na placenta; BEDDINGTON & ROBERTSON, 1989). Entretanto, as CTE não se diferenciam em trofotoderma e, conseqüentemente, não compõem o córion. Por outro lado, as células tronco trofotodérmicas, que são exclusivamente derivadas do trofotoderma do blastocisto contribuem, em quimeras, apenas para a formação coriônica (TANAKA *et al.*, 1998).

Em bovinos, PICARD *et al.* (1990) demonstraram, pela agregação, a competência de células de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento. Neste experimento, a MCI de blastocistos (de 8 dias) foi agregada com mórulas

(de 5,5 dias), ou seja, células já com restrições em sua distribuição (MCI) com aquelas sem (mórulas). Disso foram obtidos oito embriões quiméricos, os quais, após inovulação, geraram 6 animais nascidos, 5 deles quiméricos e com traços fenotípicos predominantemente oriundos da MCI agregada.

Não obstante, como ferramenta científica, embriões poliploides (mais comumente os $4n$), têm sido utilizados com frequência em experimentos direcionados ao entendimento da biologia do desenvolvimento tais como, mecanismos embrionários que regulam o tamanho e o número de células, bem como influenciam a taxa de clivagem. Além disso, eles têm sido utilizados para modelos de entendimento de polissomia humana e do equilíbrio genômico parental (LIU et al., 2004; DAVOLI et al., 2010; HUNA et al., 2011).

4.4.1. Tetraploidia embrionária e quimerismo

O conceito de tetraploidia é bastante difundido na biotecnologia da produção embrionária. Embriões $4n$ podem ser produzidos por meio da inibição da clivagem ou pela fusão dos blastômeros (SHINOZAWA *et al.*, 2006). No primeiro, visa-se a inibição da clivagem a fim de permitir a duplicação do material genético sem divisão celular subsequente utilizando, para tanto, fatores inibitórios como a colchicina (EDWARDS, 1958) ou a citocalasina B (SNOW, 1973; TARKOWSKI *et al.*, 1977). Já no segundo método, blastômeros $2n$ (estágio embrionário de 2 células) podem ser fundidos com o emprego de polietileno glicol (EGLITIS, 1980; SPINDLE, 1981), vírus Sendai inativo (O'NEILL *et al.*, 1990) ou por eletro fusão (BERG, 1982; KUBIAK & TARKOWSKI, 1985).

A técnica de fusão dos blastômeros $2n$, mediante a passagem direta da corrente elétrica, consiste na forma mais utilizada e, aparentemente, mais eficiente da indução de tetraploidia em embriões. Isto foi mais bem demonstrado quando KRIVOKHARCHENKO *et al.* (2002) verificaram que as taxas de fusão de embriões de ratos com polietileno glicol (56,3 %) são significativamente inferiores às aquelas obtidas mediante a eletrofusão (96,1 %).

KUBIAK & TARKOWSKI (1985) fundiram blastômeros de embriões de camundongos, no estágio de 2 células, utilizando um pulso de 1 kV/cm com duração entre 100 e 250 μ s e conseguiram produzir blastocistos $4n$, embora não tenham se desenvolvido a termo. SHINOZAWA *et al.* (2006) realizaram experimento análogo, mais recente e com ratos, também observando o mesmo desenvolvimento posimplantacional incompleto.

De forma semelhante, mas em coelhos, OZIL & MODLINSKI (1986) fundiram embriões com um pulso de 3 kV/cm durante 1000 μ s e, além de blastocistos tetraploides expandidos, recuperaram uma estrutura em mosaico ($2n/4n$) e conseguiram obter a termo indivíduos normais, aferindo a eficiência da técnica.

PROCHAZKA *et al.* (2004) compararam o padrão de desenvolvimento de embriões de suínos $2n$ e $4n$ e verificaram desenvolvimento similar entre ambas as ploidias embrionárias, no entanto, PRATHER *et al.* (1996) foram além e microinjetaram células da MCI de embriões $2n$ no espaço perivitelino de blastocistos $4n$, também na espécie suína. Com isso, demonstraram a possibilidade de obter um feto oriundo de um embrião com trofotoderma $4n$.

Apesar de bastante difundida e padronizada em camundongos (NAGY *et al.*, 1993), a técnica de eletrofusão, em embriões bovinos produzidos *in vitro*, só

obteve êxito nos últimos dez anos com a produção *in vitro* de blastocistos 4n (CURNOW *et al.*, 2000) mediante a utilização de 1 pulso de 1,4 kV/cm com duração de 100 μ s. Em seguida, IWASAKI *et al.* (2000a) expandiram as possibilidades da técnica com o nascimento de bezerros quiméricos oriundos da agregação de CTE (2n) com embriões 4n produzidos por eletrofusão e utilizando para tanto dois pulsos de 1 kV/cm por 25 μ s.



Figura 3. Bezerros quiméricos derivados da agregação de células semelhantes às CTE com embriões tetraploides (IWASAKI *et al.*, 2000a).

DARABI *et al.* (2008) testaram vários parâmetros de voltagem (0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 kV/cm) e do tempo do eletrochoque (20; 40; 60; 80 e 100 μ s) e verificaram que os melhores resultados de fusão, clivagem e desenvolvimento, na espécie bovina, foram com a utilização de um pulso de 0,75 kV/cm durante 60 μ s.

4.5. Relevância do quimerismo embrionário

Atualmente, a produção de quimeras embrionárias é um procedimento viável e que possibilita a obtenção de informações relacionadas aos mecanismos da

pluripotência, da embriogênese e da organogênese (BARNES, 1976; TARKOWSKI, 1998; NAGY *et al.*, 2003).

Além disso, as quimeras se apresentam como uma poderosa ferramenta (independentemente da técnica empregada para a sua produção) nos estudos de CTE (WOOD *et al.*, 1993). Devido a sua capacidade de diferenciação, as CTE oferecem um instrumento indispensável para estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, no campo da genética, do desenvolvimento embrionário e na investigação de algumas doenças (NAGY & VINTERSTEN, 2006; DRAPER & NAGY, 2007).

Estudos desse tipo são essenciais em se tratando da abordagem terapêutica das CTE, pois, conhecendo o destino, o comprometimento e a diferenciação dessas células, torna-se possível estudar mecanismos de controlar esses processos - *in vivo* e *in vitro*. Assim, o quimerismo é uma ferramenta importante e viável para estudos relacionados tanto ao conhecimento básico como ao aplicado (NAGY, 2004).

As quimeras embrionárias também podem ser utilizadas para analisar o comportamento celular de um fenótipo mutante, relevante para o estudo de diversas doenças, inclusive ligadas ao comportamento animal (LOW-ZEDDIES & TAKAHASHI, 2005; PAPAIOANNOU & GARDNER, 1979; TAM & ROSSANT, 2003).

Embora o camundongo seja o mamífero mais estudado nesta técnica, já foram produzidas quimeras embrionárias em diversos mamíferos, como rato, coelho, ovinos, caprinos, bovinos e em humanos, além de terem sido produzidas quimeras interespecíficas, utilizando camundongos (*Mus musculus* e *Mus caroli*) e

ruminantes (ovelha e cabra; POLZIN *et al.*, 1987; TARKOWSKI, 1998, respectivamente).

Cabe salientar que, atualmente, a prova máxima (“*gold standard*”) para o diagnóstico *in vivo* da pluripotência de qualquer linhagem de CTE obtida (de ratos ou camundongos) é um método de quimerismo. No ensaio de complementação tetraploide (*Tetraploid Complementation Assay*), a agregação de CTE com dois embriões 4n (modelo “sanduíche”) permite que nasçam animais saudáveis - e 100% derivados das CTE - apenas quando as CTE foram plenamente pluripotentes. Neste caso, além da parte somática, os animais nascidos terão as suas células germinativas derivadas das CTE e passarão, via gameta, o genótipo destas para sua prole (NAGY *et al.*, 2003).

Nesse sentido, as quimeras embrionárias de camundongos são de grande importância por representarem um bom modelo animal para o próprio quimerismo de outras espécies, principalmente aquelas de interesse comercial zootécnico, em que a logística e o custo, dos experimentos, são sempre mais elevados e complexos.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- BARNES, R. D. The use of early embryo aggregation derived mouse chimaeras to study immunological tolerance. **A Tool of Immunogenetics**. v. 3. pps. 347-56. 1976.
- BEDDINGTON, R. S. P.; ROBERTSON, E. J. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. **Development**, v. 105, p. 733-737, 1989. Disponível em: <http://dev.biologists.org/content/105/4/733.full.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2010.
- BERG H., Fusion of blastomeres and blastocistys of mouse embryos. **Bioelectrochem Bioenerg**. V.9, p. 223-228, 1982.
- BOEDIONO, A., SUZUKI, T., LI, L.Y., GODKE, R.A. Offspring born from chimeras reconstructed from parthenogenetic and in vitro fertilized bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.159-170, 1999.
- CURNOW, E. C. GUNN, I. M. TROUNSON, A. O. Electrofusion of two-cell bovine embryos for the production of tetraploid blastocysts in vitro. **Molecular Reproduction and Development**. V. 56, p. 372-377, 2000.
- DARABI, M.R., NASR-ESFAHANI, M.H., BAHARVAND, H., MARDANI, M., KARIMI-JASHNI, H. Fusion and development of 2-cell bovine embryos to tetraploid blastocyst with different voltages and durations. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**. V.6, p.181-186, 2008.
- DAVOLI T, DENCHI EL, DE LANGE T. Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. **Cell**. V. 141(1), p.81-93, 2010.

- DRAPER, J. S; NAGY, A. Improved embryonic stem cell technologies. **Handbook Exp Pharmacology**. v. 178. pps. 107-28. 2007.
- EDWARDS, J.L., KING, W.A, KAWARSKY, S.J., EAL Y, A.D.. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP 70 and glutathione. **Theriogenology**, v. 55, p. 209-23, 2001.
- EDWARDS, R.G. Conchicine induced heteroploidy in the mouse: The induction of tetraploidy and other types of heteroploidy. **J. Exp. Zool.** V. 137, p. 349-362, 1958.
- EGLITIS, M.A. Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethelyneglycol. **J. Exp. Zool.** V.213, p. 309-313, 1980.
- EVERETT, C. A., WEST, J. D. Evidence for selection against tetraploid cells in tetraploid – diploid mouse chimeras before the late blastocyst stage. **Genet. Res.** V. 72, p. 225-228, 1998.
- EVERETT, C. A., WEST, J. D. The influence of ploidy on the distribution of cells in chimeric mouse blastocysts. **Zygote**. V. 4, p. 59-66, 1996.
- FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A.; FARIN, C.E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.65, p.178–191, 2006.
- GILES, J.R.; YANG, X.; MARK, W.; FOOTE, R.H. Pluripotency of cultured rabbit inner cell mass cells detected by isozyme analysis and eye pigmentation of fetuses following injection into blastocysts or morulae. **Molecular Reproduction and Development**. v.36. pps. 130-38. 1993.

- HUNA A, SALMINA K, JASCENKO E, DUBURS G, INASHKINA I, ERENPREISA J. Self-Renewal Signalling in Presenescent Tetraploid IMR90 Cells. **J Aging Res.** doi:10.4061/2011/103253, 2011.
- IWASAKI, S., CAMPBELL, K. H. S., GALLI, C., AKIYAMA, K., IWASAKI, S. Production of live calves derived from embryonic stem-like cells aggregated with tetraploid embryos. **Biology of Reproduction.** V. 62, p. 470-475, 2000a.
- IWASAKI, S., TAKADA, T., IIDA, K., TSUJIMOTO, G., IWASAKI, S. GFP Expression in Mouse Fetuses Derived from Aggregation of Embryonic Stem Cells with Diploid or Tetraploid Embryos. **Journal of Mammalian Ova Research.** v. 17. n.1 pps. 15-22. 2000b.
- JIA, W., YANG, W., LEI, A., GAO, Z., YANG, C., HUA, J., HUANG, W., MA, X., WANG, H., DOU, Z. A caprine chimera produced by injection of embryonic germ cells into a blastocist. **Theriogenology.** v.69. pps. 340-48. 2008.
- KRIVOKHARCHENKO, A., GALAT,V., GANTEN, D., BADER, M. *In vitro* formation of tetraploid rat blastocysts after fusion of two-cell embryos. **Mol. Reprod. Dev.**V. 61, p. 460–465, 2002.
- KUBIAK, J. Z., TARKOWSKI, A. J. Electrofusion of mouse blastomeres. **Exp. Cell. Res.** V. 157, p. 561-566, 1985.
- LEE, K.; CHUANG, C.; WANG, H. W.; STONE, L.; CHEN, C.; TU, C. An alternative simple method for mass production of chimeric embryos by coculturing denuded embryos and embryonic stem cells in Eppendorf vials. **Theriogenology.** v. 67. pps. 228–37. 2007.

- LIU, L., CZERWIEC, E., KEEFE, D.L. Effect of ploidy and parental genome composition on expression of Oct-4 protein in mouse embryos. **Gene expression Patterns**. V. 4, p.433-441, 2004.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos — Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17–22, 2008.
- LOW-ZEDDIES, S. S. L.; TAKAHASHI, J. S. Mouse Chimeras and Their Application to Circadian Biology. **Methods in Enzymology**. v. 393. pps. 478-92. 2005.
- LU, T. & MARKERT, C. L. Manufacture of diploid/tetraploid chimeric mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 77. n. 10. pps. 6012-16. 1980.
- MACKAY, G. E.; WEST, J. D. Fate of tetraploid cells in $4n \leftrightarrow 2n$ chimeric mouse blastocysts. **Mechanisms of Development**. v. 122. pps. 1266–81. 2005.
- MEIRELLES FV, BIRGEL EH, PERECIN F, BERTOLINI M, TRALDI AS, PIMENTEL JR, KOMNINOU ER, SANGALLI JR, NETO PF, NUNES MT, POGLIANI FC, MEIRELLES FD, KUBRUSLY FS, VANNUCCHI CI, SILVA LC. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). **Reprod Fertil Dev**. V. 22(1), p. 88-97, 2010.
- MONTEIRO F, FERREIRA M, POTIENS J, EBERHARDT B, TRINCA L, BARROS C. Influence of Superovulatory Protocols on *In vitro* Production of Nellore (*Bos indicus*) Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.860-4, 2009.

- NAGY A, ROSSANT J, NAGY R, ABRAMOW-NEWERLY W, RODER JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. V.90, pps. 8424-28, 1993.
- NAGY, A. *Lineage marking*. In: ROBERT LANZA. Handbook of stem cells. Edição. Boston: Elsevier. v.1. chap. 57. pps. 573-578. 2004.
- NAGY, A. *Production of Chimeras*. In: NAGY, A.; GERTSENSTEIN, M.; VINTERSTEN, K.; BEHRINGER, R. Manipulating the Mouse Embryo - A Laboratory Manual. 3rd edition. Ed Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 453. 2003.
- NAGY, A.; VINTERSTEN K. Murine embryonic stem cells. **Methods in Enzymology**. v. 418. 2006.
- O'NEIL, G.T., SPEIRS, S., KAUFMAN, M.H. Sex chromosome constitution of post-implantation tetraploid mouse embryos. **Cytogenet Cell Genet**. V. 53, p191-195, 1990.
- OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. Animais transgênicos e nocautes. **Ciência hoje**. v.25, n. 146, p. 19. 1999.
- OZIL, J. P., MODLINSKI, J. A. Effects of electric field on fusion rate and survival on two-cell rabbit embryos. **J. Embryol. Exp. Morphol**. V. 96, p. 211-228, 1986.
- PAPAIOANNOU, V.; GARDNER, R. L. Investigation of the lethal yellow Ay\Ay embryo using mouse chimaeras. **J. Embryol. exp. Morph**. v. 52. pps. 153-63. 1979.
- PESQUERO, J. B.; BAPTISTA, H. A.; MOTTA F. L. T.; OLIVEIRA S. M. Aplicações dos animais transgênicos. **Scientific American Brasil**. edição 56. 2007.

- PICARD, L.; CHARTRAIN, I.; KING, W.A.; BETTERIDGE, K.J. Production of chimaeric bovine embryos and calves by aggregation of inner cell masses with morulae. **Molecular Reproduction and Development**, v.27, p.295-304, 1990.
- POLZIN, V. J.; ANDERSON, D. L.; ANDERSON, G. B.; BONDURANT, R. H.; BUTLER, J. E.; PASHENS, R. L.; PENEDO, M. C. T.; ROWE, J. D. Production of Sheep-Goat Chimeras by Inner Cell Mass. **Journal of Animal Science**. v. 65. pps. 325-30. 1987.
- PRATHER, R. S., HOFFMAN, K.E., SCHOENBECK, R.A., STUMPF, T.T., LI, J. Characterization of DNA synthesis during the 2-cell stage and the production of tetraploid chimeric pig embryos. **Molecular Reproduction Development**. V. 45, p. 38-42, 1996.
- PROCHAZKA, R., VODICKA, P., ZUDOVA, D., RYBAR, R., MOTLIK, J. Development of in vitro derived diploid and tetraploid pig embryos of in vivo modified médium NCSU 37. **Theriogenology**. V. 62, p. 155-164, 2004.
- RHO, G.J.; KANG, T.Y.; KOCHHAR, H.P.S.; HAHNEL, A.C.; BETTERIDGE, K.J. Effect of blastomere sex and fluorescent labelling on the development of bovine chimeric embryos reconstituted at the four-cell stage. **Molecular Reproduction and Development**, v.60, p.202-07, 2001.
- ROSSANT, J.; CROY, B. A.; CHAPMAN, V. M.; SIRACUSA, L.; CLARK, D. A. Interspecific Chimeras in Mammals: a New Experimental System. **Journal of Animal Science**. v. 55. pps. 1241-48. 1982.

- ROSSANT, J.; FRELS, W. I. Interspecific Chimeras in Mammals: Successful Production of Live Chimeras Between *Mus musculus* and *Mus caroli*. **Science**. v. 208. pps. 419-21. 1980.
- ROSSANT, J.; SPENCE, A. Chimeras and mosaics in mouse mutant analysis. **Trends in genetics**. v. 14. 1998.
- SAKKAS, D.; VASSALLI, J.D. The preimplantation embryo: development and experimental manipulation. **Reproductive health**. 2:1. 2008. Disponível em: http://www.gfmer.ch/Books/Reproductive_health/The_preimplantation_embryo_o_Development_and_experimental_manipulation.html. Acessado em: 02/06/2009, às 17h.
- SHINOZAWA T., SUGAWARA, A., MATSUMOTO, A., HAN, Y-J., TOMIOKA, I., INAI, K. SASADA, H. KOBAYASHI, E., MATSUMOTO, H., SATO, E. Development of rat tetraploidy and chimric embryos aggregated with diploid cells. **Zygote**, v.14, p. 287-297, 2006.
- SNOW, M.H.L. Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage. **Nature**. V. 244, p. 513-515, 1973.
- SPINDLE, A. Polyethylene glycol-induced fusion of two-cell mouse embryo blastomeres. **Exp. Cell. Res.** V. 131, p. 465-470, 1981.
- TAM, P. P. L.; ROSSANT, J. Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. **Development**. v. 130. pps. 6155-63. 2003.
- TANAKA, S., KUNATH, T., HADJANTONAKIS, A.K., NAGY, A., ROSSANT, J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. **Science**. V. 282, pps. 2072-2075, 1998..

- TARKOWSKI A.K., WITKOWSKA, A., OPAS, J. Development of cytochalasin B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos. **J. Embryo Exp. Morphol**, v. 41, p. 47-67, 1977.
- TARKOWSKI, A. K. Mouse chimaeras revisited: recollections and reflections. **International Journal of Developmental Biology**. v. 42. pps. 903-08. 1998.
- WELLS, D. Production of Chimeras Derived from Murine Embryonic Stem Cells. **Methods in Molecular Biology**. v. 180. pps. 127-49. 2002.
- WILLIAMS, T.J., MUNRO, R.K., SHELTON, J.N. Production of Interspecies Chimeric Calves by Aggregation of *Bos indicus* and *Bos taurus* Demi-embryos. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 2, PPS. 385-94, 1990.
- WOLF, A.; GABALDI, S.H.; GARCIA, J.M. Produção de embriões bovinos quiméricos utilizando-se células da massa celular interna ou células semelhantes às tronco-embrionárias (ES-like-cells) de bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.145 (abst), 2004.
- WOLPERT, L. Biologia do desenvolvimento. 3ª Edição. Porto Alegre: **Artmed**,. 576p, 2008.
- WOOD, S. A.; PASCOE, W. S.; SCHMIDT, C.; KEMLER, R.; EVANS, M. J.; ALLEN, N. D. Simple and Efficient Production of Embryonic Stem Cell-Embryo Chimeras by Coculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 90. n. 10. pps. 4582-85. 1993.

Capítulo 2

Produção de blastocistos quiméricos *Bos taurus* e *Bos indicus* mediante a agregação de embriões diploides e tetraploides

Este artigo científico está de acordo com as normas para publicação no periódico ***Reproductive Biology and Endocrinology*** (BioMed Central open Access), exceto pelo idioma. Endereço eletrônico: <http://www.rbej.com/>

Produção de blastocistos quiméricos *Bos taurus* e *Bos indicus* mediante a agregação de embriões diploides e tetraploides

Eduardo M Razza¹, Rafael A Satrapa^{1*}, Isabele P Emanuelli,^{1*} ,Ciro M Barros¹, Marcelo FG Nogueira^{1,2§}

¹Departamento de Farmacologia, IB, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas, FCL, UNESP, Assis, São Paulo, Brasil.

§E-mail: marcelo@assis.unesp.br

*Estes autores contribuíram igualmente para o trabalho

§ Autor para correspondência

Endereços de e-mail:

EMR: eduardorazza@gmail.com

RAS: rsatrapa@yahoo.com.br

IPE: isabelevet@hotmail.com

CMB: cmbarros@ibb.unesp.br

MFGN: marcelo@assis.unesp.br

RESUMO

Contexto: No quimerismo por agregação, células embrionárias oriundas de fertilizações distintas se distribuem aleatoriamente para formar um único indivíduo. Entretanto, a formação de embrião tetraploide (4n), por eletrofusão, e a posterior agregação com um embrião diploide (2n) resulta em um embrião quimérico, porém com massa celular interna (MCI) exclusivamente 2n. Logo, a agregação de um embrião 4n zebuínio (*Bos indicus*; termorresistente) com um 2n taurino (*Bos taurus*; termosensível) resultaria em MCI exclusivamente taurina, porém com o trofotoderma (futuro córion) de maior composição zebuína, podendo constituir um modelo para estudos de adaptação gestacional deste embrião/feto em clima tropical. O objetivo do presente trabalho foi padronizar a produção de embriões 4n da raça Nelore (*Bos indicus*) bem como o quimerismo por agregação entre embriões 2n mestiços ($\frac{1}{2}$ *Bos taurus* e $\frac{1}{2}$ *Bos indicus*) com 4n *Bos indicus*.

Material e Métodos: Oócitos provenientes de vacas da raça Nelore foram maturados, fertilizados com sêmen de touros Nelore ou Holandês e cultivados em meio SOF. Embriões Nelore com 2 células (30 h pós-inseminação, hpi) foram selecionados para a eletrofusão e utilizando vários parâmetros, como o número de pulsos (1 ou 2), a voltagem (0,4; 0,5; 0,75; 1,0; 1,4; 5,0 kV/cm) e a duração do eletrochoque (20; 25; 50; 60 μ s). Embriões 4n zebuínos e embriões 2n $\frac{1}{2}$ taurinos (ambos 72 hpi) foram tratados com protease (remoção da zona pelúcida) e com fitohemaglutinina, como agente aglutinador. Pares de embriões 2n e 4n ($\frac{1}{2}$ *B.*

taurus e *B. indicus*, respectivamente) foram agregados e cultivados até o estágio de blastocisto em poços individuais.

Resultados: Os melhores resultados de fusão (92%) e de clivagem pós-fusão (66%) foram obtidos com um pulso de 0,75 kV/cm, por 60 μ s. A produção de blastocistos 4n foi de 31,5%, com estes parâmetros. Quatro quimeras (13%) embrionárias (4n+2n) desenvolveram-se até o estágio de blastocisto.

Conclusão: Foi validada a produção de embriões tetraploides zebuínos por eletrofusão e o quimerismo entre embriões 4n e 2n (*B. indicus* e $\frac{1}{2}$ *B. taurus*, respectivamente). A provável distribuição não aleatória das células 4n pode permitir a utilização, do presente modelo experimental, em pesquisas aplicadas sobre a interação materna-coriônica-fetal em ambientes tropicais do Brasil.

Palavras chave: Quimerismo embrionário, agregação, tetraploidia, gado bovino, *Bos taurus*, *Bos indicus*.

Contexto

Introdução

A técnica do quimerismo vem sendo desenvolvida - de modo intraespécie - com embriões de camundongos [1-4], ratas [5], coelhas [6], ovelhas [7], cabras [8], porcas [9-11] e vacas [12-14]. Alguns experimentos, no entanto, obtiveram sucesso na produção de quimeras interespecies entre camundongos (*Mus musculus* e *Mus carolis*; [15]) e entre pequenos (ovelhas e cabras [16,17]) e grandes ruminantes (*Bos taurus* e *Bos indicus*; [18,19]).

A tetraploidia espontânea é uma aberração cromossômica relativamente rara que ocorre em mamíferos, descrita primariamente em murinos [20]. Porém, a tetraploidia pode ser induzida em embriões mediante a inibição da clivagem para permitir a duplicação do material genético sem divisão celular utilizando, para tanto, fatores inibitórios como a colchicina [21] ou a citocalasina B [22,23]. Outro método para a produção de embriões tetraploides é mediante a fusão de blastômeros diploides, em embriões no estágio de duas células, com o uso de polietileno glicol [24,25], do vírus Sendai inativado [26] ou da eletrofusão [27,28].

Embriões tetraploides foram capazes de desenvolverem-se, normalmente, até o estágio de blastocisto em camundongos [29], ratos [30], coelhos [31] e gado bovino [32,33]. Desse modo, foi possível a utilização destes embriões na formação de quimeras com agregados de células tronco embrionárias [34,12] ou com embriões diploides [35].

Em quimeras tetraploides/diploides ocorre um padrão não aleatório de distribuição celular no concepto formado. Nestas quimeras, as células tetraploides vão contribuir para formar o tecido extraembrionário (trocotoderma e, posteriormente, o córion), mas não a

massa celular interna. Logo, os indivíduos nascidos a partir desta técnica serão compostos apenas pela contribuição das células diploides agregadas [36]. Em camundongos, a agregação de células tronco embrionárias com embriões diploides mostrou que elas podiam compor vários tecidos ao passo que, quando elas foram agregadas com embriões tetraploides, resultaram em embriões com a massa celular interna formada exclusivamente pelas mesmas [27,37].

Devido à necessidade de parâmetros adequados para a realização da eletrofusão e, em virtude da falta de consenso quanto aos parâmetros já utilizados para produção de embriões tetraploides em várias espécies de mamíferos [12,28,31,32,35,38,39], um dos objetivos deste trabalho foi avaliar o efeito do número de pulsos elétricos (1 ou 2), a intensidade da voltagem (0,4; 0,5; 0,75; 1,0; 1,4 e 5,0 kV/cm) e a duração do eletrochoque (20; 25; 50 e 60 μ s) na fusão e no desenvolvimento de embriões *Bos indicus* produzidos *in vitro*. O outro objetivo foi a produção de quimeras embrionárias pela agregação destes embriões tetraploides (*B. indicus*) com embriões mestiços diploides ($\frac{1}{2}$ *B. taurus*) produzidos simultaneamente *in vitro*.

Esta abordagem pressupõe um modelo experimental mais amplo, no qual ocorreria, durante a gestação de um conceito quimérico *B. indicus* (4n) com *B. taurus* (2n), a integração entre o córion placentário (2n+4n) com um feto exclusivamente de origem taurina (2n). Tal modelo permitiria futuras investigações sobre os efeitos que um componente placentário, oriundo de uma raça termorresistente, poderia exercer sobre a gestação de um animal de origem europeia, e termossensível, em um país de clima tropical como o Brasil.

Material e Métodos

Produção *in vitro* de embriões

Todos os reagentes e meios foram adquiridos dos Laboratórios Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Gibco (Langley, OK, USA; soro fetal bovino), Vivimed (Ribeirão Preto, SP, Brasil; Choriomon[®]) e Hertape Calier (Juatuba, MG, Brasil; Pluset[®]).

Recuperação e classificação dos oócitos

O processo de produção *in vitro* de embriões baseou-se na técnica descrita por Eberhardt *et al.* [40]. Os ovários, coletados em frigoríficos e provenientes de animais zebuínos em dias aleatórios do ciclo estral, foram transportados em recipientes térmicos contendo solução salina (NaCl 0,9%) mantida em uma temperatura entre 30 e 37°C.

As aspirações foliculares foram realizadas com agulhas 19 G acopladas a seringas de 10 mL. Folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm foram puncionados e o fluido folicular com os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) imaturos foram depositados em tubos cônicos estéreis (Corning[®]) e imersos em Banho Maria à 37°C. Após sedimentação, os COCs foram classificados em quatro categorias, de acordo com suas características celulares [41]: I) oócitos com citoplasma homogêneo, circundados por três ou mais camadas compactas de células do *cumulus*; II) oócitos com menos de três camadas de células do *cumulus* ou parcialmente desnudos, porém com granulação homogênea no citoplasma; III) oócitos circundados apenas por células da *corona radiata*; IV) oócitos desnudos.

Maturação *in vitro*

COCs das categorias I, II e III foram lavados três vezes em meio TCM 199 com HEPES contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 µg/mL de piruvato e 75 µg/mL de amicacina. Após isso, eles foram lavados duas a três vezes no meio de maturação e distribuídos em 4 gotas (média de 25 COCs/gota) contendo 90 µL deste meio e cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri (Corning®) de 35 x 10 mm. O meio de maturação utilizado foi o TCM 199 com bicarbonato contendo 10% de SFB, 2 µg/mL de piruvato, 75 µg/mL de amicacina, 20 µg/mL de FSH (Pluset®) e 10 UI/mL de LH (Choriomon®). Os meios, preparados com 2 horas de antecedência, foram mantidos a 39°C em incubadora. A maturação dos COCs foi realizada em incubadora a 39°C (5% de CO₂ em ar), durante 22 a 24 horas.

Preparo do sêmen e fertilização *in vitro*

O aquecimento da palheta, de sêmen criopreservado, foi realizado em água a 37°C por 30 s. Em seguida, o sêmen foi depositado sobre a superfície do gradiente de Percoll com densidade descontínua (2 mL a 45% sobre 2 mL a 90%), em tubo cônico de 15 mL e centrifugado a 900 x g por 30 min.

Durante a centrifugação do sêmen, os COCs já maturados foram lavados três vezes no meio TCM 199 com HEPES e uma vez no meio de fertilização, antes de serem transferidos para gotas, do mesmo meio, e cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri de 35 mm x 10 mm.

Após a centrifugação, os espermatozoides viáveis obtidos do sedimento foram submetidos à avaliação de motilidade (lâmina e lamínula) e concentração (câmara de

Neubauer), ambos sob microscopia óptica, e diluídos em volume apropriado do meio de fertilização para uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL.

Em seguida, foi realizada a fertilização dos oócitos utilizando 10 μ L de sêmen diluído por gota, durante 10 a 12 horas, a 39°C, em 5 % de CO₂ em ar. O meio de fertilização consistiu de TALP-FIV suplementado com 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos, 2 μ L/mL de piruvato, 75 μ g/mL de amicacina, 11 μ g/mL de heparina e 44 μ L/mL de solução de Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina (PHE).

Desnudamento e cultivo *in vitro* dos embriões

Entre 10 a 12 horas pós inseminação (hpi) os prováveis zigotos foram transferidos do meio de fertilização para tubos cônicos, com 1 mL de meio TCM 199 com HEPES conforme descrito anteriormente, os quais foram submetidos à agitação (“vortex” Phoenix[®], AP-56) a 3000 rpm, durante 3 a 5 minutos, para a remoção das células do *cumulus* circundantes ao oócito, bem como dos espermatozoides associados. Em seguida, os prováveis zigotos foram lavados duas vezes em meio TCM 199 com HEPES e, por último, uma vez em meio de cultivo, sendo então transferidos para gotas de cultivo de 90 μ L (20 a 25 oócitos/gota), cobertas com óleo mineral, em placas de Petri de 35 mm. Foi utilizado o meio de cultivo SOF (“synthetic oviduct fluid” [42]), acrescido de 25% de SFB, 5% de BSA e 0,2% de piruvato de sódio.

Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões foram colocadas em sacos plásticos contendo uma mistura gasosa de 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂ (White Martins, São Paulo, SP, Brasil). As trocas parciais do meio de cultivo foram realizadas a cada 48 horas, quando foram retirados 50 μ L do meio presente na gota, juntamente com estruturas degeneradas, e acrescentado o mesmo volume de meio de cultivo fresco.

Produção *in vitro* de embriões tetraploides

Oócitos bovinos, oriundos de fêmeas com fenótipo majoritariamente ou totalmente da raça Nelore (*B. indicus*), foram maturados, fertilizados com sêmen da mesma raça e cultivados conforme protocolo descrito anteriormente.

Após 30 a 35 hpi, embriões Nelore com duas células - e caracterizados pela presença de um eixo interblastômeros com a nítida separação das células entre si - foram selecionados, retirados do meio de cultivo *in vitro* e lavados em gotas de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) acrescido de 10% de SFB. Em seguida, eles foram lavados duas vezes em meio de fusão para, então, serem posicionados com o eixo interblastômeros em paralelo aos eletrodos da câmara de eletrofusão (BTX Microslide Model #450-1; espaço intereletrodos de 1 mm) e previamente preparada para o procedimento com 0,5 mL do meio de fusão. O meio de fusão utilizado foi o Manitol 0,28 M, acrescido de 0,05% de BSA, 0,01 mM de MgSO₄, 0,05 mM de CaCl₂ e pH ajustado entre 7,2 e 7,4. Para produzir os pulsos elétricos foi utilizado o eletrofusor ECM 830 (BTX[®], Harvard Apparatus, Massachusetts, EUA). Logo após a emissão do pulso elétrico, os embriões foram lavados duas vezes em meio de cultivo antes de retornarem para a incubadora e o cultivo *in vitro*, conforme descrito anteriormente.

O sucesso da fusão foi avaliado após 1 hora da emissão do pulso elétrico, quando os embriões fundidos corretamente perderam o eixo interblastômeros e apresentaram uma membrana citoplasmática única em todo o perímetro embrionário (Figura 3-B).

Foram testados vários parâmetros diferentes para a eletrofusão, como a presença ou não de um pulso para o pré-alinhamento (5 kV/cm; 5 s), número de pulsos elétricos (1 ou 2), intensidade da voltagem (0,4; 0,5; 0,75; 1,0; 1,4 e 5,0 kV/cm) e duração do eletrochoque (20; 25; 50 e 60 µs).

Procedimentos para a agregação embrionária e produção de quimeras

Oócitos bovinos oriundos de fêmeas com fenótipo predominantemente da raça Nelore foram maturados, fertilizados com sêmen taurino (raça Holandesa Preta e Branca; *Bos taurus*) e cultivados, concomitantemente, aos embriões *B. indicus* conforme descrito anteriormente.

Embriões, de ambas composições raciais e ploidias, em estágios de desenvolvimento pré-compactação (8 a 16 células) foram submetidos ao tratamento com solução de protease a 0,5% (Pronase E[®]; Kaken Kagaku, Chiba, Japan) para a remoção da zona pelúcida.

Em seguida, os embriões foram lavados em meio TCM 199 com Hapes e tratados com uma concentração de 500 µg/mL de fitohemaglutinina (FHA) durante 3 minutos. Os embriões - pares de *B. indicus* 4n e mestiço *B. taurus* 2n - foram depositados em poços prontos (Embryo GPS, SunIVF, EUA) ou produzidos em placas de Petri estéreis (baseado na metodologia “WOW” descrita por Vajta *et al.* [43]) previamente preenchidos com meio de cultivo e cobertos com óleo mineral. O par de embriões foi mantido em estreito contato físico visando a sua agregação [44] conforme a Figura 1. Uma vez agregadas, as quimeras foram cultivadas até o estágio de blastocisto expandido (Dias 8 a 9 conforme descrito para a produção *in vitro*).

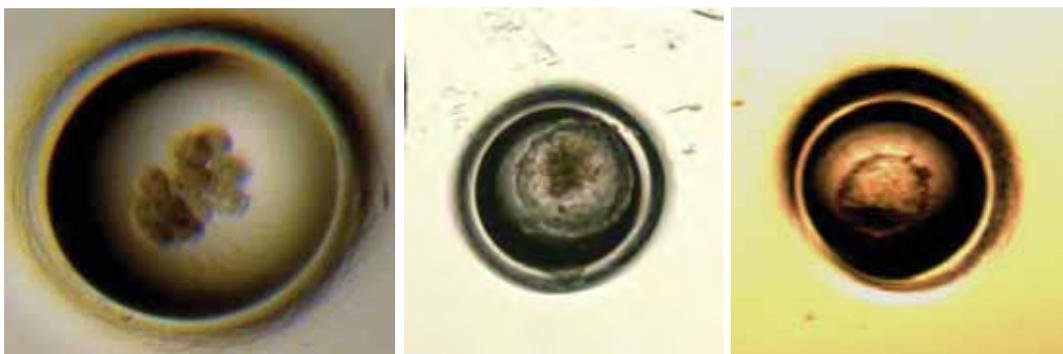


Fig. 1. Imagens ilustrativas do contato realizado em um par de embriões sem zona pelúcida, em estágio de desenvolvimento de 8 células e dentro de um poço para agregação do tipo “WOW” (esquerda; arquivo pessoal de I. P. Emanuelli) e de blastocistos expandidos quiméricos bovinos (centro e direita).

Grupos experimentais

Embriões produzidos *in vitro* (PIV), tanto *Bos indicus* quanto mestiços *B. taurus*, não submetidos a nenhum tipo de tratamento além daqueles inerentes à PIV, compuseram um controle interno da própria PIV.

Os agregados embrionários entre *B. taurus* (2n) e *B. indicus* (4n), com viabilidade celular suficiente para se agregar e desenvolver como um único embrião, consistiram no grupo experimental quimera.

De modo adicional, foram utilizados para a agregação pares de embriões *B. indicus* diploides, de acordo com a disponibilidade de estruturas após a formação do grupo experimental quimera, que compuseram o grupo controle quimera.

As taxas foram comparadas aos pares (Tabelas 1 e 2) ou entre três ou mais grupos (Tabela 1), mediante o Teste exato de Fisher e o Teste do Qui Quadrado, respectivamente,

utilizando o software SigmaStat for Windows versão 3.10 (Systat Software Inc., 2004). A significância foi considerada quando o $P < 0,05$.

Resultados

Produção *in vitro* de embriões bovinos

A taxa de clivagem, bem como de formação de mórulas, blastocistos e blastocistos eclodidos do controle PIV foram, respectivamente, 85,3; 62,2; 23,1 e 18,1%, em embriões *Bos indicus* não selecionados para a eletrofusão (n=238 oócitos fertilizados). Para o controle PIV de embriões mestiços *B. taurus* (não selecionados para a agregação), as taxas de desenvolvimento foram de 66,1; 46,6; 11,8 e 7,6%, respectivamente para clivagem, mórulas, blastocistos e blastocistos eclodidos (n=118 oócitos fertilizados).

Produção *in vitro* de embriões tetraploides

Na Figura 2, estão imagens ilustrativas dos primeiros embriões eletrofundidos e competentes, quanto ao desenvolvimento até blastocisto expandido, que validaram a técnica. As taxas de fusão e clivagem pós-fusão encontram-se na Tabela 1.

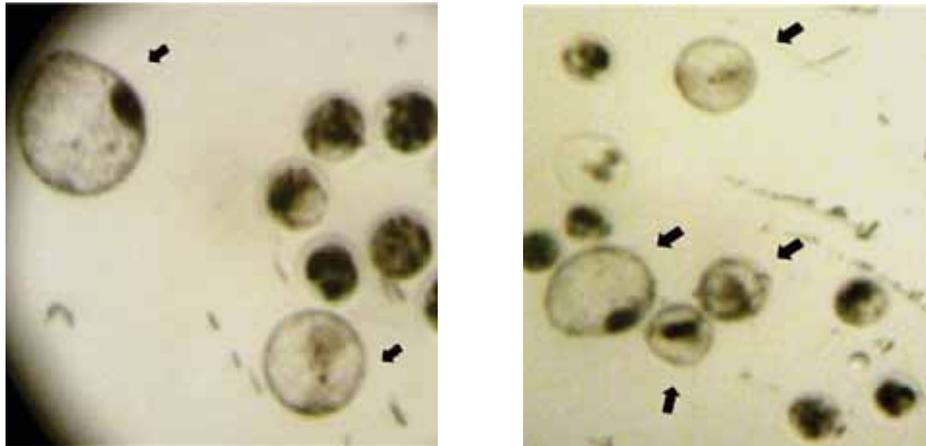


Fig. 2. Imagens ilustrativas de blastocistos tetraploides bovinos (*Bos indicus*), iniciais e expandidos, produzidos após eletrofusão com a voltagem de 0,75 kV/cm por 60 μ s.

Tabela 1. Diferentes parâmetros testados, para a emissão do pulso elétrico, na tentativa de eletrofusão de embriões bovinos com 2 células, produzidos *in vitro* e da raça Nelore, bem como suas respectivas taxas de fusão e de clivagem pós-fusão.

Pulso Pré-alinhamento	Número de Pulsos	Voltagem (kV/cm)	Duração do pulso (μ s)	Embriões utilizados	Taxa de fusão (%)	Taxa de clivagem (%)
5 kV/cm;5 s	2	0,4	50	25	36 ^b	0
-	2	0,5	25	15	80 ^a	0
-	1	0,75	60	100	93 ^a	71
-	1	1,0	50	50	14 ^c	0
-	1	1,4	25	34	9 ^c	0
-	1	5,0	20	10	10 ^c	0

^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferença estatística entre as taxas de fusão.

Com relação à posterior clivagem, a melhor taxa de fusão (93%) foi obtida com o uso de apenas 1 pulso de 0,75 kV/cm durante 60 μ s. Com exceção do parâmetro de 2 pulsos de 0,5 kV/cm durante 25 μ s (semelhante ao parâmetro descrito anteriormente), as demais combinações testadas dos parâmetros resultaram em menor taxa de fusão. Desse modo, houve diferença significativa entre as taxas de fusão dos 6 diferentes conjuntos de parâmetros testados ($P < 0,001$). Na Figura 3 podem ser observadas as características dos embriões pré (A) e pós (B) fusão, quanto à avaliação morfológica do procedimento.

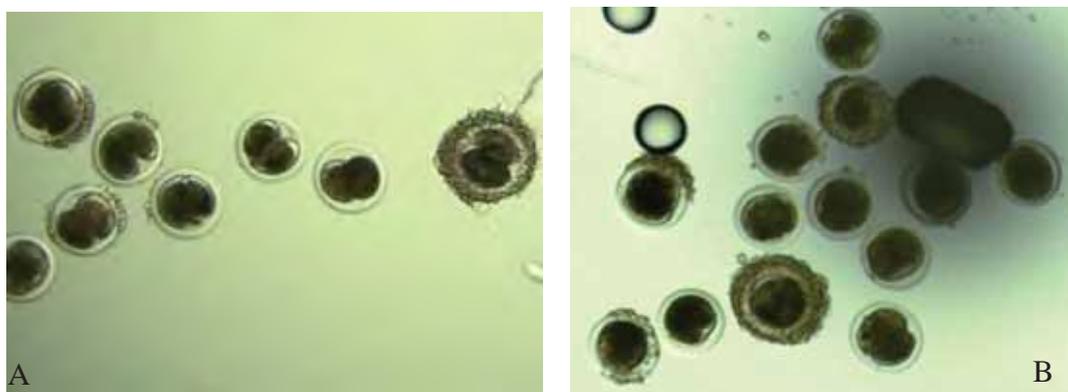


Fig. 3. A) Embriões, *Bos indicus* e produzidos *in vitro*, de duas células (30 hpi) antes do protocolo de eletrofusão. O eixo interblastômeros é evidente na maioria deles. B) Os mesmos embriões, mostrados em A, após a emissão do eletrochoque e já fundidos ou em processo de fusão, em sua maioria, visível devido à perda do eixo interblastômeros.

Entretanto, o desenvolvimento pós-fusão, avaliado pela taxa de clivagem 30 horas pós-eletrochoque, somente ocorreu com os parâmetros de 0,75 kV/cm durante 60 μ s e resultou em 71%.

Na validação da produção de embriões *B. indicus* tetraploides, a taxa de produção de blastocistos foi de 43%, com base nos embriões de duas células selecionados para o procedimento de eletrofusão (43/100).

Produção de quimeras embrionárias bovinas

Foram realizadas quatro replicatas para a produção de embriões quiméricos *B. indicus* (4n) com mestiços *B. taurus* (2n). Do total de 48 tentativas de agregação entre pares de embriões, 31 foram do grupo experimental quimera (interespecies e com diferentes ploidias) e 17 do grupo controle quimera. As taxas, de agregação e de blastocistos quiméricos produzidos, foram semelhantes em ambos os grupos ($P>0,5$; Tabela 2) e, em conjunto, resultaram em 56,3 e 14,6%, respectivamente.

Tabela 2. Pares de embriões utilizados, taxa de agregação destes pares e taxa de formação de blastocistos quiméricos dos grupos controle quimera (*Bos indicus*, 2n) e experimental quimera [mestiço *B. taurus* (2n) com *B. indicus* (4n)].

	Pares embrionários (n)	Taxa de Agregação % (n)	Taxa de Blastocistos % (n)
Controle quimera	17	52,9 (9)	17,6 (3)
Experimental quimera	31	58,1 (18)	12,9 (4)
Total	48	56,3 %	14,6 %

Quando considerada a taxa de blastocistos quiméricos a partir dos pares de embriões efetivamente agregados, não houve diferença estatística significativa entre os grupos controle quimera (33,3%; 3/6) e experimental quimera (22,2%; 4/14; $P>0,5$).

Discussão

Os resultados obtidos na PIV, especialmente quanto às taxas de formação de blastocistos (23,1 e 11,8% para *Bos indicus* e mestiço *B. taurus*, respectivamente), dos embriões não submetidos a tratamento experimental foram um pouco aquém, em termos de valores absolutos, daqueles obtidos por Satrapa *et al.* [45] com *B. indicus* (34,7%), mas foram similares aos obtidos, recentemente, com mestiço *B. taurus* (10,4%) no mesmo laboratório (Silva CF, comunicação pessoal). A produção *in vitro* pode apresentar tais variações, dentro de um mesmo laboratório, em curtos períodos de tempo, dentro de uma mesma raça ou entre raças distintas. Essa variação, entretanto, ainda que esteja aquém do esperado não comprometeu o objetivo principal do trabalho que visou a obtenção de estruturas quiméricas viáveis contendo ambas as raças e ploidias.

Quanto à padronização dos parâmetros da eletrofusão, aplicados para a produção de embriões tetraploides, alguns pormenores merecem atenção. O pulso de pré-alinhamento (corrente alternada) foi testado com apenas um conjunto de parâmetros e não foi eficiente em sua função de alinhar o eixo interblastomérico, do embrião de duas células, paralelamente aos eletrodos. Sendo assim, o alinhamento manual, e com a ajuda de uma agulha 19 G esterilizada, foi utilizado para esta finalidade e considerado adequado. Corroborando que o pulso de corrente alternada, para alinhar o embrião pré-fusão, não é essencial, Darabi *et al.* [46] utilizaram o alinhamento manual e apenas corrente direta para a fusão de embriões bovinos.

O pulso definido como adequado, tanto para a fusão quanto a posterior clivagem e desenvolvimento embrionário, foi um pulso único de corrente direta com 75 V por 60 μ s em uma câmara de fusão com 1 mm de espaço entre os eletrodos, equivalendo a 0,75

kV/cm. Esta voltagem é relativamente baixa em comparação com o utilizado por outros autores [12,28,31,32,35,38,39]. Na espécie bovina, Iwasaki *et al.* [12] utilizando um pulso de 1,0 kV/cm por 25 μ s, obtiveram uma taxa de 75,5% de clivagem pós-fusão, enquanto Curnow *et al.* [32] obtiveram 72,1% de clivagem pós-fusão com um pulso de 1,4 kV/cm durante 100 μ s. Ambos os resultados foram semelhantes aos observados no presente experimento, no qual foi verificada uma taxa de clivagem pós-fusão de 71%.

Darabi *et al.* [46] por sua vez, com os mesmos parâmetros utilizados neste trabalho (0,75 kV/cm; 60 μ s) obtiveram, em termos numéricos absolutos, valores ligeiramente inferiores quanto a taxa de fusão (69 vs 93%) e de clivagem pós-fusão (66 vs 71%) de embriões bovinos PIV. Desse modo, pode ser inferido que os parâmetros validados neste experimento, como viáveis para a produção de embriões *Bos indicus* tetraploides, possam ser distintos dos padronizados anteriormente para embriões *B. taurus*, visto as diferenças fisiológicas descritas entre ambas as espécies.

Os agregados quiméricos, produzidos em sua totalidade, tiveram taxas pouco elevadas de agregação (56,3%) e de blastocistos (14,6%) quando comparadas com as de Boediono *et al.* [13]. Estes autores, usando ágar como agente aglutinador, obtiveram taxas de 93 e 88%, respectivamente na agregação e na formação de blastocistos bovinos quiméricos de embriões PIV e partenogênicos, em estágio de desenvolvimento semelhante àqueles utilizados no presente experimento. Entretanto, as diferenças entre os agentes aglutinadores utilizados (fitohemaglutinina vs ágar), a origem do embrião agregado (tetraploide vs partenogênico), a espécie utilizada nas quimeras (100% *B. taurus* vs ~75% *B. indicus*), além de potenciais diferenças inerentes aos sistemas de PIV, poderiam ser responsáveis por estas diferenças observadas.

Além disso, a taxa total de blastocistos quiméricos produzidos (14,6%) neste experimento poderia ser considerada inferior quando comparada com a obtida naquele de Williams *et al.* [19], onde 15 bezerros quiméricos (*B. indicus* e *B. taurus*) foram produzidos a partir de 112 embriões inovulados (13,4% de gestação). Entretanto, os embriões utilizados por estes autores foram produzidos *in vivo* e com manipulação menos artificial (bipartição), o que minimizaria os danos inerentes da manipulação embrionária. Não obstante, o presente experimento aventou a possibilidade de agregar, de forma similar, embriões interespecíficos (mestiço *B. taurus* com *B. indicus*), porém com indução da tetraploidia em embriões PIV, uma conjunção que requer maior período de manipulação e, logo, uma maior resistência embrionária.

Assim, uma razoável explicação para a baixa taxa de sobrevivência (isto é, dos blastocistos quiméricos produzidos) pode ser em decorrência do excesso de manipulação - quer pela própria PIV quer pela tetraploidia induzida - dos embriões neste estágio inicial de desenvolvimento (8 a 16 células), no qual se sabe que os embriões são particularmente sensíveis a várias formas de estresse [47,48]. Não podem ser excluídos desta análise, os efeitos negativos da baixa produção *in vitro* dos embriões, neste experimento, e a progressiva aquisição de destreza manual, na execução das técnicas pelo operador, como fatores aditivos para a taxa de 14,6% de quimeras produzidas.

A avaliação morfológica indica que foram produzidos blastocistos quiméricos mestiço *B. taurus* (2n) com *B. indicus* (4n). É esperado que, nestas estruturas, a contribuição do componente diploide, do agregado, seja predominante na massa celular interna, enquanto o componente tetraploide *B. indicus* contribua exclusivamente na formação de futuros elementos extraembrionários, ou seja, no trofotoderma do blastocisto quimérico [49-51]. Essa potencial distribuição tecidual dos genótipos das espécies bovinas

(*B. indicus* 4n exclusivamente no córion e *B. taurus* 2n exclusivamente no feto), proposto como modelo neste experimento, permitiria futuras avaliações - sob ambiente tropical - da comunicação entre placenta e feto, respectivamente oriundos de raça bovina termorresistente (zebuína) e termossensível (taurina). Tal comunicação, placentária-fetal, já foi proposta em camundongos como sendo ativa e regulatória do desenvolvimento hipotalâmico fetal [52]. Neste trabalho, Broad & Keverne propuseram que, sob privação alimentar por 24 horas da fêmea gestante, a placenta ativamente - e, parcialmente, via o gene *Peg3* com *imprinting* materno - compensou a privação alimentar e manteve, às suas custas, o crescimento hipotalâmico fetal [52].

O padrão não aleatório de distribuição celular, em decorrência da ploidia celular, está classicamente estabelecido em camundongos [53]. Entretanto, existe a possibilidade de que nem todos os embriões fundidos tornem-se efetivamente tetraploides, principalmente se os prováveis embriões tetraploides, a serem agregados, estiverem em fases pós-compactação [34]. Tal fato (isto é, a perda da tetraploidia após a eletrofusão, em embriões peri-compactação) suportaria neste, e em futuros experimentos, a escolha por embriões em estágios pré-compactação, do desenvolvimento, como a melhor opção para a produção de quimeras embrionárias por agregação.

Conclusão

Os resultados morfológicos indicam a viabilidade da produção de embriões quiméricos mestiço *B. taurus* (2n) com *B. indicus* (4n). No entanto, o estabelecimento de gestações, do desenvolvimento *in vivo* destas quimeras e, principalmente, de seu

nascimento, deve ser realizado a fim de validar, no genótipo e no fenótipo dos neonatos, o padrão não aleatório de distribuição das células tetraploides do agregado quimérico.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesses.

Contribuição dos autores

MFGN e EMR elaboraram o projeto de pesquisa. CMB e MFGN forneceram o suporte estrutural, aparatos técnicos e coordenaram os experimentos. EMR e RAS padronizaram a produção dos embriões tetraploides mediante a eletrofusão. EMR e IPE produziram as quimeras embrionárias. Todos os autores participaram da elaboração e revisão do manuscrito, logo estão cientes e aprovam a versão final do mesmo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP pelo suporte financeiro do projeto e das bolsas concedidas. Além disso, a Profa. Dra. Fernanda Cruz Landim e Alvarenga pela gentileza no empréstimo de equipamento eletrofusor Eppendorf, Naiara Z. Saraiva e Bruna C. S. Campanha pelo auxílio nos testes iniciais do eletrofusor BTX com embriões de camundongo.

Referências bibliográficas

- [1] Evans M, Kaufman M: **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.** *Nature* 1981, **6**:292–154.
- [2] Li XY, Jia Q, Di KQ, Gao SM, Wen XH, Zhou RY, *et al.*: **Passage number affects the pluripotency of mouse embryonic stem cells as judged by tetraploid embryo aggregation.** *Cell Tissue Res* 2007, **327**:607–14.
- [3] Li X, Yu Y, Wei W, Yong J, Yang J, You J, *et al.*: **Simple and efficient production of mice derived from embryonic stem cells aggregated with tetraploid embryos.** *Mol Reprod Dev* 2005, **71**:154–8.
- [4] Lee KH, Chuang CK, Wang HW, Stone L, Chen CH, Tu CF: **An alternative simple method for mass production of chimeric embryos by coculturing denuded embryos and embryonic stem cells in Eppendorf vials.** *Theriogenology* 2007, **67**:228–37.
- [5] Iannaccone P, Taborn G, Garton R, Caplice MD, Brenin DR: **Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras.** *Dev Biol* 1994, **163**:288–92.
- [6] Schoonjans L, Albright GM, Li JL, Collen D, Moreadith RW: **Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts.** *Mol Reprod Dev* 1996, **45**:439–43.
- [7] Butler JE, Anderson GB, BonDurant RH, Pashen RL, Penedo MCT: **Production of ovine chimeras by inner cell mass transplantation.** *J Anim Sci* 1987, **65**:317–24.

- [8] Jia W, Yang W, Lei A., Gao Z, Yang C., Hua J, Huang W, Ma X, Wang H, Dou Z: **A caprine chimera produced by injection of embryonic germ cells into a blastocyst.** *Theriogenology* 2008, **69**:340–8.
- [9] Onishi A, Takeda K, Komatsu M, Akita T, Kojima T: **Production of chimeric pigs and the analysis of chimerism using mitochondrial deoxyribonucleic acid as a cell marker.** *Biol Reprod* 1994, **51**:1069–74.
- [10] Anderson GB, Choi SJ, BonDurant RH: **Survival of porcine inner cell masses in culture and after injection into blastocysts.** *Theriogenology* 1994, **42**:204–12.
- [11] Nagashima H, Giannakis C, Ashman RJ, Nottle MB: **Sex differentiation and germ cell production in chimeric pigs produced by inner cell mass injection into blastocysts.** *Biol Reprod* 2004, **70**:702–7.
- [12] Iwasaki S, Campbell KHS, Galli C, Akiyama K, Iwasaki S: **Production of live calves derived from embryonic stem-like cells aggregated with tetraploid embryos.** *Biology of Reproduction* 2000, **62**:470–5.
- [13] Boediono A, Suzuki T, Li LY, Godke RA: **Offspring born from chimeras reconstructed from parthenogenetic and in vitro fertilized bovine embryos.** *Molecular Reproduction and Development* 1999, **53**:159–70.
- [14] Saito S, Sawai K, Ugai H, Moriyasu S, Minamihashi A, Minamihashi A, Yamamoto Y, Hirayama H, Kageyama S, Pan J, Murata T, Kobayashi Y, Obata Y, Yokoyama KK: **Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, **309**:104–13.
- [15] Rossant, J, Frels WI: **Interspecific chimeras in mammals: Successful production of live chimeras between *Mus musculus* and *Mus earoli*.** *Science* 1980, **208**:419.

- [16] Polzin VJ, Anderson DL, Anderson GB, BonDurantRll, Butler 35, Pashen RL, Penedo MCT, Rowe ID: **Production of sheep <-> goat chimeras by inner cell mass transplantation.** *J Anim Sci* 1987, **65**:325–30
- [17] Roth TL, Anderson GB, Bon Durant RH, Pashen RL: **Survival of sheep X goat hybrid inner cell masses after injection into ovine embryos.** *Biology of reproduction* 1989, **41**:675–82.
- [18] Summer, PM, Shelton JB, Bell K: **Synthesis of primary Bos taurus-Bos indicus chimeric calves.** *Anita Reprod Sci* 1983, **6**:91.
- [19] Williams TJ, Munro RK, Shelton JN: **Production of Interspecies Chimeric Calves by Aggregation of Bos indicus and Bos taurus Demi-embryos.** *Reprod Fertil Dev* 1990, **2**:385–94.
- [20] Beatty RA, Fischber M: **Heteroploidy in mammals. III. Induction of tetraploidy in preimplantation mouse eggs.** *Genet* 1952, **50**:471–9.
- [21] Edwards RG. Colchicine-induced heteroploidy in the mouse. II: **The induction of tetraploidy and other types of heteroploidy.** *Exp Zool* 1958, **137**:349–62.
- [22] Snow MHL: **Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage.** *Nature* 1973, **244**:513–5.
- [23] Tarkowski AK, Witkowska A, Opas J: **Development of cytochalasin B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos.** *J Embryol Exp Morphol* 1977, **41**:47–67.
- [24] Eglitis MA: **Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethelyneglycol.** *J Exp Zool* 1980, **213**:309–13
- [25] Spindle A: **Polyethylene glycol-induced fusion of two-cell mouse embryo blastomeres.** *Exp Cell Res* 1981, **131**:465–70.

- [26] O'Neil GT, Speirs S, Kaufman MH: **Sex chromosome constitution of post-implantation tetraploid mouse embryos.** *Cytogenet Cell Genet* 1990, **53**:191–5.
- [27] Berg H: **Fusion of blastomeres and blastocysts of mouse embryos.** *Bioelectrochem Bioenerg* 1982, **9**:223–8.
- [28] Kubiak JZ, Tarkowski AJ: **Electrofusion of mouse blastomeres.** *Exp Cell Res* 1985, **157**:561–6.
- [29] Kaufman MH, Webb S: **Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion.** *Development* 1990, **110**:1121–32.
- [30] Krivokharchenko A, Galat V, Ganten D, Bader M: **In vitro formation of tetraploid rat blastocysts after fusion of two-cell embryos.** *Mol Reprod Dev* 2002, **61**:460–5.
- [31] Ozil JP, Modlinski JA: **Effects of electric field on fusion rate and survival of 2-cell rabbit embryos.** *J Embryol Exp Morphol* 1986, **96**:211–28.
- [32] Curnow EC, Gunn IM, Trounson AO: **Electrofusion of two-cell bovine embryos for the production of tetraploid blastocysts in vitro.** *Molecular Reproduction and Development* 2000, **56**:372–7.
- [33] Iwasaki S, Kono T, Fukatsu H, Nakahara T: **Production of bovine tetraploid embryos by electrofusion and their developmental capability in vitro.** *Gamete Res* 1989, **24**:261–7.
- [34] Iwasaki S, Ito Y, Iwasaki S: **In-Vitro Development of Aggregates of Bovine Inner Cell Mass Cells or Bovine Mammary Cells and Putative Tetraploid Embryos Produced by Electrofusion.** *J Reprod and develop* 1999, **45**:1.
- [35] Shinozawa T, Sugawara A, Matsumoto A, Han YJ, Tomioka I, Inai K, Sasada H, Kobayashi E, Matsumoto H, Sato E: **Development of rat tetraploidy and chimric embryos aggregated with diploid cells.** *Zygote* 2006, **14**:287–97.

- [36] James RM, Klerkx A, Keighren M, Flockhart JH, West JD: **Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid-diploid chimaeras.** *Developmental Biology* 1995, **167**:213–26.
- [37] James RM, West JD: **A chimaeric animal model for confined placental mosaicism.** *Human Genetic* 1994, **93**:603–4.
- [38] Prochazka R, Vodicka P, Zudova D, Rybar R, Motlik J: **Development of in vitro derived diploid and tetraploid pig embryos of in vivo modified médium NCSU 37.** *Theriogenology* 2004, **62**:155–64.
- [39] Prather RS, Hoffman KE, Schoenbeck RA, Stumpf TT, Li J: **Characterization of DNA synthesis during the 2-cell stage and the production of tetraploid chimeric pig embryos.** *Molecular Reproduction Development* 1996, **45**:38–42.
- [40] Eberhardt BG, Satrapa RA, Capinzaiki CR, Trinca LA, Barros CM: **Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat.** *Anim Reprod Sci* 2009, **114**:54–61.
- [41] Khurana NK, Niemann H: **Energy metabolism in preimplantation bovine derived in vitro or in vivo.** *Biol Reprod* 2000, **62**:847–56.
- [42] Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H: **High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins.** *Theriogenology* 1999, **52**:683–700.
- [43] Vajta G, Peura Tt, Holm P, Páldi A, Greve T, Callesen H, Trounsen Ao: **A new method for individual embryo culture: the well of the well (WOW) System.** *Theriogenology* 2000, **53**.

- [44] Basile LF, Rodrigues JL: **Influence of glucose on in vitro development rate of *Mus domesticus domesticus* 1-cell stage embryos in Hepes supplemented KSOM or HTF media.** *Acta Scientiae Veterinariae* 2002, **30**:79–85.
- [45] Satrapa RA, Nabhan T, Silva CF, Simões RAL, Razza EM, Puelker RZ, Trinca LA, Barros CM: **Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of *in vitro*-produced bovine embryos.** *Theriogenology*, in press.
- [46] Darabi MR, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H, Mardani M, Karimi-Jashni H: **Fusion and development of 2-cell bovine embryos to tetraploid blastocyst with different voltages and durations.** *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2008, **6**:181–6.
- [47] Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel W: **High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows.** *Theriogenology* 1998, **49**:657–65.
- [48] Al-Katanani YM, Hansen PJ: **Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development.** *Mol Reprod Dev* 2002, **62**:174–80.
- [49] Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC: **Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**:8424–28.
- [50] Ueda O, Jishage K, Kamada N, Uchida S, Suzuki H: **Production of mice entirely derived from embryonic stem (ES) cell with many passages by coculture of ES cells with cytochalasin B induced tetraploid embryos.** *Experimental Animals* 1995, **44**:205–10.

- [51] Wang ZQ, Kiefer F, Urbanek P, Wagner EF: **Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection.** *Mechanisms of Development* 1997, **62**:137–45.
- [52] Broad KD, Keverne EB: **Placental protection of the fetal brain during short-term food deprivation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, **Aug 2** (Epub ahead of print).
- [53] Nagy A: **Production of Chimeras.** In: Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R: *Manipulating the Mouse Embryo - A Laboratory Manual.* 3rd edition. Edited by Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003:453.

Considerações finais

Considerações finais

A hipótese de que a agregação de embriões *Bos indicus* tetraploides e diploides (sêmen da raça Holandesa preta e branca - *Bos taurus* - e oócitos da raça Nelore) produziriam quimeras bovinas com desenvolvimento *in vitro*, incluindo a formação de blastocistos expandidos, de modo semelhante aos embriões produzidos *in vitro* oriundos da raça Nelore foi rejeitada devido à menor taxa de blastocistos quiméricos (12,9%) quando comparada àquela dos blastocistos do grupo controle da PIV (23,1%).

O presente trabalho validou, no aspecto morfológico, a produção de embriões bovinos tetraploides da raça Nelore (*Bos indicus*) com o Eletrofusor BTX (Harvard Apparatus, Massachusetts, EUA) e nas condições do laboratório onde o experimento foi executado.

Apesar das dificuldades encontradas, foi possível validar morfológicamente a produção de embriões quiméricos *B. taurus* e *B. indicus* com ambas ploidias. No entanto, pesquisas posteriores nesta área, que cooptem a inovulação destes embriões em receptoras para o estabelecimento de gestações, são imperativas e poderiam confirmar a composição genotípica e fenotípica dos animais nascidos e validar o padrão não-aleatório da distribuição das células tetraploides em agregados quiméricos bovinos.

Experimentos neste âmbito permitiriam analisar o grau de contribuição de elementos extra-embriônicos (córion), de origem zebuína, presentes em um concepto cujo feto seja exclusivamente taurino, na adaptabilidade deste feto aos climas tropical e equatorial.