

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

**INTERAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMÁTICA EM EMBRIÕES E
EXPRESSÃO DE GENES “IMPRINTED” EM FETOS BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VIVO*, *IN VITRO* E PARTENOGENÉTICOS**

Simone Cristina Méo Niciura

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

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

JABOTICABAL – SP
Dezembro – 2005

M551i Méo-Niciura, Simone Cristina
Interação núcleo-citoplasmática em embriões e expressão de genes “imprinted” em fetos bovinos produzidos *in vivo*, *in vitro* e partenogênicos / Simone Cristina Méo Niciura. – – Jaboticabal, 2005
xxiii, 115 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2005

Orientador: Joaquim Mansano Garcia

Banca examinadora: Flávio Vieira Meirelles, Claudia Lima Verde Leal, Vera Fernanda M. H. de Lima e Gisele Zoccal Mingoti

Bibliografia

1. Desenvolvimento embrionário. 2. Partenogênese. 3. “Genomic imprinting”. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:591.162:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

e-mail: simone@iz.sp.gov.br

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



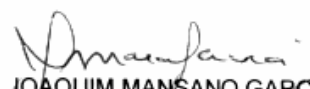
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INTERAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMÁTICA EM EMBRIÕES E EXPRESSÃO DE
GENES "IMPRINTED" EM FETOS BOVINOS PRODUZIDOS IN VIVO, IN
VITRO E PARTENOGENÉTICOS

AUTORA: **SIMONE CRISTINA MÉO NICIURA**

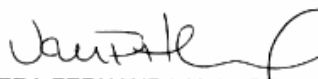
ORIENTADOR: **Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA**

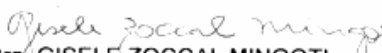
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA
VETERINÁRIA (REPRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora:


Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

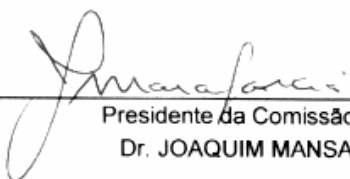

Dr. FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES


Dra. CLAUDIA LIMA VERDE LEAL


Dra. VERA FERNANDA M. H. DE LIMA


Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Data da realização: 19 de dezembro de 2005.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SIMONE CRISTINA MÉO NICIURA - nascida em São Carlos – SP, aos 10 dias do mês de agosto de 1977, concluiu o curso colegial na Escola Estadual de Segundo Grau “Dr. Álvaro Guião”, na cidade de São Carlos - SP, em dezembro de 1994; ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista - UNESP, em fevereiro de 1995; participou do Programa Especial de Treinamento – Grupo PET/CAPEs, de agosto de 1996 a março de 1999; obteve bolsa de iniciação científica da FAPESP, junto ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, de abril a dezembro de 1999; concluiu, em janeiro de 2000, o curso superior em Medicina Veterinária; ingressou, em março de 2000, no curso de pós-graduação, em nível de Mestrado, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, com bolsa de Mestrado da FAPESP e concluiu, em fevereiro de 2002, com a defesa da Dissertação “ATIVACÃO PARTENOGENÉTICA E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE OÓCITOS BOVINOS TRATADOS COM ESTRÔNCIO, IONOMICINA E 6-DIMETILAMINOPURINA”; ingressou no curso de pós-graduação, em nível de Doutorado, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, em março de 2002, com bolsa de Doutorado da FAPESP; foi aprovada em Concurso Público do Governo do Estado de São Paulo – Secretaria da Agricultura e Abastecimento – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios e assumiu o cargo de Pesquisador Científico I na Área de Biologia Molecular Animal, no Centro de Pesquisa de Desenvolvimento de Genética e Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa – SP, em março de 2005.

“Se enxerguei mais longe
foi porque estava sobre os ombros de gigantes”.

(Isaac Newton)

Dedico ao meu marido,
Cristiano Luchesi Niciura,
que me acompanha por toda a jornada,
com amor, compreensão, inspiração,
idealismo e companheirismo.

Dedico a meus pais,
Pedro Luiz Méo e Vera Lucia Barrionovo Méo,
pelo carinho, dedicação, exemplo de vida,
entusiasmo e motivação.

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador, **Joaquim Mansano Garcia**, que, desde o primeiro ano de graduação, me acompanha, com grande empenho e brilhantismo, no trilhar desse caminho.

Aos professores, **Cláudia Lima Verde Leal, Flávio Vieira Meirelles, Gisele Zoccal Mingoti, Cesar Roberto Esper, Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, João Ademir de Oliveira, Maria Angélica Miglino, Gilson Helio Toniollo e Paulo Henrique Franceschini**, pela amizade, interesse, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos de laboratório, **Ana Paula Perini, Christina Ramires Ferreira, Felipe Perecin, Juliana Corrêa Borges, Lorivaldo Paz Landim Jr., Max Vitória Resende, Naiara Zoccal Saraiva, Roberta Vantini, Tatiane Tetzner, Walt Yamazaki**, pela solidariedade, intercâmbio de idéias, momentos de descontração, auxílio na presença ou na distância, amizade e convivência inesquecível.

Aos amigos do DMVPRA, **Alexandre, Andréa, Eric, Eliana, Érika, Gabriel, Gerson, Giovana, Isabel, Karina, Kleber, Letícia, Mabel, Marcelo Seneda, Marcelo Roncoletta, Sandra, Tânia, Viviane**, pelo companheirismo, festas, viagens e congressos memoráveis.

Aos familiares e amigos **André, Liliane, Tia Águida, Tio João, Tio Paulinho, Tia Regina, Paulo, Vó Fina, Tia Regina Célia, Lucas, Madrinha Ana, D. Jandira, Sr. Pedro, Leandro, Alexandre, Adriane, Débora, Daniel, José Antônio, Neusa, Keila, Laura, Eveline, Daniela Oliveira, Fabrício**, pelo incentivo.

Ao **Sr. Edgar Scatena**, proprietário da Fazenda São Sebastião, em Barrinha – SP, pelo fornecimento das fêmeas bovinas receptoras.

Aos eficientes **estagiários** que passaram pelo DMVPRA no decorrer de todos esses anos.

Aos amigos de Pirassununga, **Giovana, Raquel, Paula, Fernando, Veruska, Paulo, Moysés e Patrícia**, pela acolhida e ensinamentos.

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

Ao **Instituto de Zootecnia de Nova Odessa**, pelo suporte à continuidade do doutorado e pelas condições de trabalho, em especial ao **Centro de Genética e Reprodução Animal** e a **Paulo Bardauil Alcântara, Ivani Pozar Otsuk, Maria Aparecida Cassiano Lara, Rita Maria Ladeira Pires, Keila Maria Roncato Duarte**, e ao incentivo dos amigos **Aides, Augusta, Cecília, Cristina, Daina, Fábio, Helena, Herrera, Luciana, Patrícia, Perpétua, Silvia e Tamara**.

A **todos** que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse projeto, tanto com incentivo e auxílio quanto com apoio e amizade, nos momentos descontraídos ou desafiadores.

APOIO FINANCEIRO

Esse projeto foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, sob processo nº. 02/00971-1, no período de abril de 2002 a março de 2005.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix
INTERAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMÁTICA EM EMBRIÕES E EXPRESSÃO DE GENES “IMPRINTED” EM FETOS BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VIVO</i> , <i>IN VITRO</i> E PARTENOGENÉTICOS.....	xxii
NUCLEAR-CYTOPLASMIC INTERACTION IN EMBRYOS AND EXPRESSION OF IMPRINTED GENES IN <i>IN VIVO</i> AND <i>IN VITRO</i> PRODUCED AND PARTHENOGENETIC BOVINE FETUSES	xxiii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
Introdução.....	1
Revisão de literatura	2
Maturação <i>in vitro</i>	2
Fecundação <i>in vitro</i> e ativação partenogenética.....	3
Transferência pronuclear	4
“Genomic imprinting”	5
Falhas em biotécnicas da reprodução	7
Alterações na expressão gênica	8
Contextualização da pesquisa	10
Objetivos	11
Objetivo geral.....	11
Objetivos específicos.....	11
CAPÍTULO 2 – MATURAÇÃO NUCLEAR, DISTRIBUIÇÃO DE GRÂNULOS CORTICAIS E DINÂMICA DA FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> E DA FORMAÇÃO DE PRONÚCLEOS EM BOVINOS	13
Resumo	13
Introdução	14
Material e Métodos	16
Coleta de oócitos e maturação <i>in vitro</i>	16
Experimento I – Maturação nuclear e distribuição de grânulos corticais	16
Classificação morfológica dos oócitos	16
Coloração de cromatina e grânulos corticais	17
Experimento II – Dinâmica da fecundação <i>in vitro</i> e formação de pronúcleos.....	17
Fecundação <i>in vitro</i>	18
Imunofluorescência de tubulina e coloração de cromatina.....	18
Análise estatística	19
Resultados	19
Experimento I – Maturação nuclear e distribuição de grânulos corticais	19
Classificação morfológica dos oócitos	19
Coloração de cromatina e grânulos corticais	21

Experimento II – Dinâmica da fecundação <i>in vitro</i> e formação de pronúcleos.....	23
Imunofluorescência de tubulina e coloração de cromatina.....	23
Discussão	31
Experimento I – Maturação nuclear e distribuição de grânulos corticais	31
Experimento II – Dinâmica da fecundação <i>in vitro</i> e formação de pronúcleos.....	33
Conclusões	35
CAPÍTULO 3 – INTERAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMÁTICA ENTRE EMBRIÕES	
BOVINOS ATIVADOS COM ESTRÔNCIO E 6-DMAP.....	36
Resumo	36
Introdução.....	37
Material e Métodos	39
Coleta de oócitos e maturação <i>in vitro</i>	39
Fecundação <i>in vitro</i>	40
Ativação partenogenética	40
Condições de centrifugação	41
Embriões-controle.....	41
Preparo das pipetas de micromanipulação.....	42
Transferência pronuclear	44
Cultivo de embriões	47
Avaliação do desenvolvimento embrionário pré-implantação	47
Análise estatística	47
Resultados	47
Padronização das condições de centrifugação.....	47
Efeito da centrifugação sobre o desenvolvimento embrionário.....	48
Potencial de visualização e diferenciação dos pronúcleos	49
Capacidade de desenvolvimento após clivagem precoce ou tardia	51
Avaliação da técnica de transferência pronuclear: produção de embriões-controle ...	51
Efeito da interação núcleo-citoplasmática por transferência pronuclear sobre o desenvolvimento e o bloqueio do desenvolvimento embrionário pré-implantação	54
Discussão	56
Padronização das condições de centrifugação.....	56
Efeito da centrifugação sobre o desenvolvimento embrionário.....	56
Potencial de visualização e diferenciação dos pronúcleos	57
Capacidade de desenvolvimento após clivagem precoce ou tardia	58
Avaliação da técnica de transferência pronuclear: produção de embriões-controle ...	59
Efeito da interação núcleo-citoplasmática por transferência pronuclear sobre o desenvolvimento e o bloqueio do desenvolvimento embrionário pré-implantação	62
Conclusões	66
CAPÍTULO 4 – EXPRESSÃO DE GENES “IMPRINTED” EM FETOS BOVINOS	
PRODUZIDOS <i>IN VIVO</i>, <i>IN VITRO</i> E PARTENOGENÉTICOS	68
Resumo	68
Introdução.....	69
Material e Métodos	71
Produção <i>in vivo</i> de embriões.....	71
Produção <i>in vitro</i> de embriões	72

Coleta de oócitos e maturação <i>in vitro</i>	72
Fecundação <i>in vitro</i>	72
Ativação partenogenética	73
Cultivo de embriões	74
Inovulação dos embriões produzidos <i>in vitro</i> e ativados	74
Coleta de fetos	74
Avaliação de expressão gênica	75
Extração de RNA e transcrição reversa (RT-PCR)	75
Reação em cadeia da polimerase (PCR)	75
Eletróforese e expressão gênica relativa	77
Análise estatística	78
Resultados	78
Fetos produzidos <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e partenogenéticos	78
Extração de RNA	81
Expressão gênica relativa	82
Amostras de fetos	83
Amostras de membranas cório-alantóide	85
Relações dos padrões de expressão de <i>IGF2</i> , <i>IGF2r</i> e <i>H19</i>	88
Discussão	89
Desenvolvimento de embriões partenogenéticos	90
Avaliação de genes “imprinted” em fetos partenogenéticos	91
Influência do cultivo: comparação entre fetos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	94
Conclusões	97
CAPÍTULO 5 – IMPLICAÇÕES	98
REFERÊNCIAS	102

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2 – MATURAÇÃO NUCLEAR, DISTRIBUIÇÃO DE GRÂNULOS CORTICAIS E DINÂMICA DA FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> E DA FORMAÇÃO DE PRONÚCLEOS EM BOVINOS.....	13
Tabela 1. Proporção (porcentagem) de oócitos bovinos em Metáfase II e nas classes de distribuição de grânulos corticais (GC) após classificação morfológica dos oócitos em grau I, II e III, atrésico e desnudo e maturação <i>in vitro</i> por 24h.....	22
Tabela 2. Proporção (porcentagem) de maturação nuclear (Metáfase II) em oócitos bovinos de acordo com classificação morfológica e de distribuição dos grânulos corticais (GC), após maturação <i>in vitro</i> por 24h.....	23
Tabela 3. Número (porcentagem) de oócitos/zigotos coletados a intervalos de 2h, de 2 a 24h após o início da fecundação <i>in vitro</i> , quanto ao estágio de progressão nuclear: MII – Metáfase II; A/T – transição Anáfase/Telófase; PN – Pronúcleo.....	28
Tabela 4. Número (porcentagem) de zigotos bovinos em estágio pronuclear de 12 a 24h após o início da fecundação. 2PN diferentes – zigotos com 2 pronúcleos de tamanhos diferentes (1 pronúcleo masculino maior e 1 pronúcleo feminino menor); 2PN iguais – zigotos com 2 pronúcleos de tamanhos iguais; 1 PN – zigotos com 1 pronúcleo.....	30
CAPÍTULO 3 – INTERAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMÁTICA ENTRE EMBRIÕES BOVINOS ATIVADOS COM ESTRÔNCIO E 6-DMAP.....	36
Tabela 1. Proporção (porcentagem) de clivagem (46-48hpf) e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Dia 7), em embriões bovinos fecundados <i>in vitro</i> (FIV) ou ativados com 5µM de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID), submetidos (centrifugado) ou não (controle) à centrifugação a 15.000xg por 15min, 14-18hpf, em HSOE com 10µg/mL de citocalasina D.....	49
Tabela 2. Proporção (porcentagem) de clivagem (46-48hpf) e de desenvolvimento até blastocisto (Dia 7), em embriões bovinos fecundados <i>in vitro</i> (FIV) ou ativados com 5µM de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID), nos quais foi possível (com PN) ou não (sem PN) a visualização dos pronúcleos, após centrifugação a 15.000xg por 15min, 24-30hpf, em HSOE com 10µg/mL de citocalasina D.....	50
Tabela 3. Proporção (porcentagem) de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Dia 7), em embriões bovinos fecundados <i>in vitro</i> (FIV) ou ativados com 5µM de ionomicina por 5min e 2mM de 6-DMAP por 4h (ID), clivados em até 28h (28h) ou entre 28 e 48h (48h) após a fecundação ou ativação.....	51

Tabela 4. Proporção (porcentagem) de formação de pronúcleo (24-30hpf), clivagem (46-48hpf) e desenvolvimento até blastocisto (Dia 7), em embriões bovinos fecundados <i>in vitro</i> (FIV); ativados com 5µM de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID); e submetidos à transferência pronuclear, no mesmo tratamento: TP-FIV; TP-IS; TP-ID.....	53
CAPÍTULO 4 – EXPRESSÃO DE GENES “IMPRINTED” EM FETOS BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VIVO</i>, <i>IN VITRO</i> E PARTENOGENÉTICOS.....	68
Tabela 1. “Primers”, tamanho dos fragmentos gerados, seqüência no GenBank e referência dos “primers” para amplificação dos genes de interesse.....	76
Tabela 2. Concentração final dos componentes utilizados na reação de PCR para amplificação dos genes de interesse.....	76
Tabela 3. Condições de termociclagem utilizadas na PCR para amplificação dos genes de interesse.....	77
Tabela 4. Média (± desvio padrão) das relações entre a intensidade da banda do gene-alvo (<i>IGF2</i> , <i>IGF2r</i> , <i>MASH2</i> , <i>XIST</i> e <i>H19</i>) e a intensidade da banda do gene de expressão constitutiva <i>GAPDH</i> (GAP), em cada amostra de feto coletada aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> (TE); fecundados <i>in vitro</i> (FIV) e ativados com 5µM de ionomicina por 5min e 2mM de 6-DMAP por 4h (ID).....	84
Tabela 5. Média (± desvio padrão) das relações entre a intensidade da banda do gene-alvo (<i>IGF2</i> , <i>IGF2r</i> , <i>MASH2</i> , <i>XIST</i> e <i>H19</i>) e a intensidade da banda do gene de expressão constitutiva <i>GAPDH</i> (GAP), em cada amostra de membrana cório-alantóide coletada aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> (TE); fecundados <i>in vitro</i> (FIV) e ativados com 5µM de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID).....	87
Tabela 6. Relação entre a intensidade das bandas dos genes <i>IGF2</i> , <i>IGF2r</i> e <i>H19</i> , em amostras de feto coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> (TE; n=3); fecundados <i>in vitro</i> (FIV; n=3) e ativados com 5µM de ionomicina por 5min e 2mM de 6-DMAP por 4h (ID; n=2).....	89
Tabela 7. Relação entre a intensidade das bandas dos genes <i>IGF2</i> , <i>IGF2r</i> e <i>H19</i> , em amostras de membranas cório-alantóide coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> (TE; n=3); fecundados <i>in vitro</i> (FIV; n=3) e ativados com 5µM de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS; n=1) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID; n=2).....	89

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 2 – MATURAÇÃO NUCLEAR, DISTRIBUIÇÃO DE GRÂNULOS CORTICAIS E DINÂMICA DA FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> E DA FORMAÇÃO DE PRONÚCLEOS EM BOVINOS.....	13
Figura 1. Classificação dos complexos <i>cumulus</i> -oócito bovinos viáveis para a maturação <i>in vitro</i> , sob microscópio estereoscópico: (a,b) Graus I, II e III; (c) grau I; (d) grau II; (e) grau III.....	20
Figura 2. Classificação dos complexos <i>cumulus</i> -oócito bovinos inviáveis para a maturação <i>in vitro</i> , sob microscópio estereoscópico: (a) atrésico; (b) desnudo.....	20
Figura 3. Distribuição dos grânulos corticais (GC) e coloração de cromatina em oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> por 24h, observados em microscópio de epifluorescência. (a) GC dispostos em “clusters” no interior do oócito (citoplasma imaturo); (b) GC em transição do centro para a periferia (citoplasma parcialmente maturo); (c) GC dispostos na periferia, abaixo da membrana vitelínica (citoplasma maturo); (d) oócito em Metáfase II (núcleo maturo) e GC em “clusters” (citoplasma imaturo); (e) oócito em Metáfase II (núcleo maturo) e GC periféricos (citoplasma maturo). Verde: GC corados com 10µg/mL de <i>Lens culinaris</i> (específica à α-D-manose) conjugada a FITC por 15min. Azul: DNA corado com 10µg/mL de Hoechst 33342 por 10min.....	21
Figura 4. Oócitos no estágio de Metáfase II (M) coletados em diferentes momentos após o início da fecundação <i>in vitro</i> (FIV). (a) 14h após FIV; (b) 16h após FIV; (c) 18h após FIV. Azul: DNA corado com 10µg/mL de Hoechst 33342 por 10min; Verde: microtúbulos ou fusos (F) marcados por imunofluorescência com anticorpo anti-α-tubulina (1:50) conjugado a FITC....	24
Figura 5. Zigotos no estágio de transição Anáfase/Telófase (A), coletados em diferentes momentos após o início da fecundação <i>in vitro</i> (FIV). (a) 10h após FIV; (b) 2h após FIV; (c-d, mesmo zigoto) 2h após FIV. Azul: DNA corado com 10µg/mL de Hoechst 33342 por 10min; Verde: microtúbulos ou fusos (F) marcados por imunofluorescência com anticorpo anti-α-tubulina (1:50) conjugado a FITC.....	25
Figura 6. Estádio pronuclear em zigotos coletados em diferentes momentos após o início da fecundação <i>in vitro</i> (FIV). a) Zigoto com 2 pronúcleos (PN) de tamanhos diferentes, 22h após FIV; (b) zigoto com 2 PN de tamanhos iguais, 20h após FIV; (c) zigoto com 1 PN, 24h após FIV. DNA corado com 10µg/mL de Hoechst 33342 por 10min. PNf: pronúcleo feminino (menor); PNm: pronúcleo masculino (maior); 2PN: dois pronúcleos de tamanhos iguais; 1PN: um pronúcleo.....	26
Figura 7. Oócito no estágio de Metáfase II (M) coletado 2h após o início da fecundação <i>in vitro</i> . (a) DNA corado com 10µg/mL de Hoechst 33342 por 10min; (b) microtúbulos marcados por imunofluorescência com anticorpo	

anti- α -tubulina (1:50) conjugado a FITC. Notar a presença de microtúbulos no corpúsculo polar (CP). CC: células do *cumulus*..... 27

Figura 8. Presença da cabeça do espermatozóide com cromatina condensada (SC), no interior dos oócitos, em diferentes momentos após o início da fecundação *in vitro* (FIV). (a) 6h após FIV; (b-d, mesmo oócito) 4h após FIV. Notar a ausência de microtúbulos no espermatozóide. Azul: DNA corado com 10 μ g/mL de Hoechst 33342 por 10min; Verde: microtúbulos marcados por imunofluorescência com anticorpo anti- α -tubulina (1:50) conjugado a FITC. M: Metáfase II; S: cabeça de espermatozóide fora do oócito..... 27

Figura 9. Porcentagem de oócitos/zigotos, coletados a intervalos de 2h, de 2 a 24h, após o início da fecundação *in vitro*, e avaliados quanto ao estágio de progressão nuclear. MII –Metáfase II; A/T –transição Anáfase/Telófase; PN –estádio pronuclear..... 29

Figura 10. Porcentagem de zigotos coletados a intervalos de 2h, de 12 a 24h após o início da fecundação *in vitro*, e avaliados quanto ao comportamento dos pronúcleos. 2PN Dif. – zigotos com 2 pronúcleos de tamanhos diferentes (1 pronúcleo masculino maior e 1 pronúcleo feminino menor); 2PN Ig. – zigotos com 2 pronúcleos de tamanhos iguais; 1 PN – zigotos com um pronúcleo..... 30

CAPÍTULO 3 – INTERAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMÁTICA ENTRE EMBRIÕES BOVINOS ATIVADOS COM ESTRÔNCIO E 6-DMAP..... 36

Figura 1. Preparação da pipeta “holding”. (a) Estiramento do capilar em bico de Bunsen; (b) mensuração do diâmetro externo do capilar em 100-150 μ m (4-6 espaços na régua); (c) aproximação do capilar à bola de vidro presente no filamento; (d) quebra espontânea do capilar após resfriamento do filamento; (e) fechamento da extremidade da pipeta por aproximação à bola de vidro do filamento aquecido; (f) extremidade da pipeta com diâmetro interno de 25 μ m; (g) realização da primeira dobra na pipeta por (h) aproximação ao filamento aquecido; (i) realização da segunda dobra na pipeta..... 43

Figura 2. Preparação da pipeta “injection”. (a) Esticador automático de pipeta P-2000 Micropipette Puller, Sutter Instrument Company; (b) programa no esticador automático; (c) capilares após estiramento; (d) mensuração do diâmetro externo do capilar em 25 μ m e aproximação do capilar à bola de vidro presente no filamento; (e) quebra espontânea do capilar após resfriamento do filamento; (f) acoplamento do capilar, sob pressão positiva com auxílio de seringa, ao esmerilhador EG-40 Micropipette Grinder (Narishige Co. Ltd.); (g) capilar no esmerilhador para a confecção do bixel; (h) aproximação da ponta do bixel à bola de vidro do filamento; (i) ponta feita na extremidade do bixel..... 44

Figura 3. Preparo e montagem da câmara de micromanipulação. (a) Câmara de micromanipulação com gota de meio HSOF coberta por óleo mineral; (b,c) microscópio invertido com câmara de micromanipulação, duas

pipetas “holdings” à esquerda e uma pipeta “injection” à direita; (d) visualização das extremidades das pipetas “holdings” e “injection” sob microscopia.....	45
Figura 4. Eletrofusão. (a) Câmara de eletrofusão; (b) ligação do pólo positivo (vermelho) à esquerda e do pólo negativo (preto) à direita da câmara de eletrofusão; (c) posicionamento do zigoto reconstituído na câmara de eletrofusão: pronúcleo transferido à esquerda (próximo ao pólo positivo) e citoplasma à direita (próximo ao pólo negativo); (d) Electrocell Manipulator 2001 BTX; (e) programação do equipamento de eletrofusão; (f) mensuração do pulso aplicado (aproximadamente, 30V) pelo BTX Enhancer.....	46
Figura 5. Zigotos submetidos à centrifugação a 15.000xg por (a) 5min e (b) 15min para separação do conteúdo lipídico e visualização do pronúcleo (seta). (b) Conteúdo citoplasmático separado em: 1) gotas de lipídeos e grandes vacúolos; 2) vesículas pequenas delimitadas por retículo endoplasmático liso; 3) matriz citoplasmática sem organelas; 4) mitocôndrias (classificado segundo CRAN et al., 1987; MADDOX-HYTTEL et al., 2004).....	48
Figura 6. Visualização dos pronúcleos feminino (PNf; menor) e masculino (PNm; maior) no interior da pipeta “injection” após enucleação de zigoto fecundado <i>in vitro</i>	50
Figura 7. Procedimento de enucleação de zigoto para transferência pronuclear. (a-b) Aspiração do pronúcleo para o interior da pipeta “injection”; (c) pronúcleo aspirado no interior da “injection” e zigoto enucleado preso à pipeta “holding”.....	52
Figura 8. Procedimento de injeção do pronúcleo para transferência pronuclear. (a) Aproximação da “injection”, com um pronúcleo em seu interior, a um zigoto enucleado fixo à “holding”; (b-c) transferência do pronúcleo do interior da “injection” para o zigoto enucleado; (d) pronúcleo transferido no interior do zigoto reconstituído.....	52
Figura 9. Embriões-controle de transferência pronuclear em zigotos ativados com ionomicina e 6-DMAP (TP-ID). (a-c) Embriões clivados nos estádios de duas a quatro células; (d) embriões nos estádios de blastocisto inicial, expandido e eclodido; (e) blastocisto em eclosão; (f) blastocisto inicial corado com 10µg/mL de Hoechst 33342 por 10min e visualizado sob microscópio de epifluorescência (330-385nm).....	54
Figura 10. Porcentagem de clivagem (46-48hpf) e desenvolvimento até oito células (Dia 4) e blastocisto (Dia 7), em embriões bovinos ativados com 5µM de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID); e submetidos à transferência pronuclear, no mesmo tratamento: TP-IS; TP-ID; e entre tratamentos: citoplasma IS e núcleo ID (CSND); citoplasma ID e núcleo IS (CDNS). ^{a,b,c,d} Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si (P<0,05).....	55
CAPÍTULO 4 – EXPRESSÃO DE GENES “IMPRINTED” EM FETOS BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VIVO</i>, <i>IN VITRO</i> E PARTENOGENÉTICOS.....	68
Figura 1. Visão macroscópica de fetos e membranas fetais obtidos aos 35	

- dias de gestação. (a) Produção *in vivo* de embriões (TE) por superovulação de receptoras seguida de monta natural; (b) produção *in vitro* de embriões por inovulação, em fêmeas previamente sincronizadas, de 6 blastocistos de 7 dias produzidos por fecundação *in vitro* (FIV)..... 78
- Figura 2.** Coleta de fetos e membranas fetais, aos 36 dias de gestação, após inovulação, em fêmeas previamente sincronizadas, de 6 blastocistos de 7 dias produzidos por (a-c) fecundação *in vitro* (Fecundado *in vitro*; FIV) e (d-f) ativação artificial com 5 μ M de ionomicina por 5min e 20mM de estrôncio por 6h (Partenogenético IS; IS)..... 79
- Figura 3.** Fetos e membranas fetais coletados aos 36 dias de gestação, após inovulação, em fêmeas previamente sincronizadas, de 6 blastocistos de 7 dias produzidos por (a-b) fecundação *in vitro* (Fecundado *in vitro*; FIV3) e (c-d) ativação artificial com 5 μ M de ionomicina por 5min e 20mM de estrôncio por 6h (Partenogenético IS; IS). (e-f) Comparação entre fetos e membranas fetais produzidos por FIV e IS..... 80
- Figura 4.** (a-c) Fetos e (d-f) membranas cório-alantóide coletados aos 35 dias de gestação, após (a,d) produção *in vivo* (TE1) de embriões por superovulação de receptoras seguida de monta natural; ou inovulação, em fêmeas previamente sincronizadas, de 6 blastocistos de 7 dias produzidos por (b,e) fecundação *in vitro* (FIV1) ou (c,f) ativação artificial com 5 μ M de ionomicina por 5min e 2mM de 6-DMAP por 4h (ID2)..... 81
- Figura 5.** Determinação da fase de amplificação exponencial dos genes *GAPDH*, *IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST* e *H19*, nas amostras de feto e membrana cório-alantóide (cório) coletadas aos 35 dias de gestação a partir de embrião bovino produzidos *in vivo* (amostra 2; TE2), por interrupção da reação em cadeia da polimerase (PCR) a intervalos de 3 a 5 ciclos (de 18 a 49 ciclos). B: amostra-controle sem DNA..... 82
- Figura 6.** Padrão de bandas, em gel de agarose corado com brometo de etídeo, do “ladder” de 100bp (L) e dos genes *GAPDH* (G), *IGF2* (I), *IGF2r* (Ir), *MASH2* (M), *XIST* (X) e *H19* (H), nas amostras de feto e membranas cório-alantóide (cório) coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo* (TE); fecundados *in vitro* (FIV) ou ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID)..... 83
- Figura 7.** Padrão de bandas, em gel de agarose corado com brometo de etídeo, das três repetições de amplificação dos genes *IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST*, *H19* e *GAPDH*, nas amostras de feto coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo* (TE); fecundados *in vitro* (FIV) ou ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min e 2mM de 6-DMAP por 4h (ID)..... 84
- Figura 8.** Média (e desvio padrão) das relações entre a intensidade da banda do gene-alvo (*IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST* e *H19*) e a intensidade da banda do gene de expressão constitutiva *GAPDH*, nas amostras de feto coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos

produzidos *in vivo* (TE; n=3); fecundados *in vitro* (FIV; n=3) e ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min e 2mM de 6-DMAP por 4h (ID; n=2). ^{a,b}Colunas com sobrescritos diferentes, no mesmo gene, diferem entre si (P<0,05)..... 85

Figura 9. Padrão de bandas, em gel de agarose corado com brometo de etídeo, das três repetições de amplificação dos genes *IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST*, *H19* e *GAPDH*, nas amostras de membranas cório-alantóide coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo* (TE); fecundados *in vitro* (FIV) e ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID).. 86

Figura 10. Média (e desvio padrão) das relações entre a intensidade da banda do gene-alvo (*IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST* e *H19*) e a intensidade da banda do gene de expressão constitutiva *GAPDH*, das amostras de membrana cório-alantóide coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo* (TE; n=3); fecundados *in vitro* (FIV; n=3) e ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS; n=1) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID; n=2). ^{a,b,c}Colunas com sobrescritos diferentes, no mesmo gene, diferem entre si (P<0,05)..... 88

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA.....	Análise de variância
ARTs.....	Tecnologias de reprodução assistida
A/T.....	Anáfase/Telófase
BAX.....	"BCL2-associated X protein"
bp.....	Pares de bases
BSA.....	Albumina sérica bovina
C.....	Citoplasma
cDNA.....	DNA complementar
CDNF.....	Citoplasma 6-DMAP e núcleo FIV
CDNS.....	Citoplasma 6-DMAP e núcleo estrôncio
CFND.....	Citoplasma FIV e núcleo 6-DMAP
CFNS.....	Citoplasma FIV e núcleo estrôncio
Cito B.....	Citocalasina B
Cito D.....	Citocalasina D
COC.....	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CP.....	Corpúsculo polar
CSND.....	Citoplasma estrôncio e núcleo 6-DMAP
CSNF.....	Citoplasma estrôncio e núcleo FIV
Cx31.....	"Connexin 31"
Cx43.....	"Connexin 43"
D.....	6-DMAP
DAT.....	"Dopamine transporter"
D.E.....	Diâmetro externo
D.I.....	Diâmetro interno
DLK1.....	"Delta-like 1"
6-DMAP.....	6-Dimetilaminopurina
DNA.....	Ácido desoxirribonucléico
FITC.....	Isotiocianato de fluoresceína
FIV.....	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH.....	Hormônio folículo estimulante
G6PD.....	"Glucose-6-phosphate dehydrogenase-like"
GAPDH.....	"Glyceraldehyde 2-phosphate dehydrogenase"
GC.....	Grânulos corticais
Glut-3.....	"Glucose transporter type 3"
Glut-4.....	"Glucose transporter type 4"
GTL2.....	"Gene trap locus 2"
GV.....	Vesícula germinativa
GVBD.....	Ruptura da vesícula germinativa
hCG.....	Gonadotrofina coriônica humana
hpf.....	Horas pós-fecundação ou ativação
HSOF.....	Fluido sintético do oviduto com hepes
Hsp70.1.....	"Heat shock protein 70"

I.....	Ionomicina
ICSI.....	Injeção espermática intracitoplasmática
ID.....	Ionomicina + 6-DMAP
<i>IGF2</i>	“Insulin-like growth factor II”
<i>IGF2r</i>	“Insulin-like growth factor II receptor” ou “cation-independent mannose 6-phosphate receptor”
IM.....	Intramuscular
<i>INS2</i>	“Insulin II”
IS.....	Ionomicina + estrôncio
LH.....	Hormônio luteinizante
<i>LIF</i>	“Leukemia inhibitory factor”
LOS.....	Síndrome do Bezerro Gigante
<i>LR-β</i>	“Lymphocyte receptor beta”
MII.....	Metáfase II
MAP.....	Proteína ativada por mitógeno
<i>MASH2</i>	“Mammalian achaete-scute homologue 2”
<i>MEG8</i>	“Maternally expressed 8”
<i>MEST</i>	“Mesoderm specific transcript” ou MEG3
MLI.....	Meio de lavagem e incubação
MIV.....	Maturação <i>in vitro</i>
MPF.....	Fator promotor de maturação
N.....	Núcleo
OPU.....	Punção folicular guiada por ultra-som
p27.....	“Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B”
p57.....	“Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C” ou <i>Kip2</i> ou “53kDa phosphoprotein”
P66 ^{shc}	“Src homology 2 domain containing” ou “66kDa phosphoprotein”
PBS.....	Solução salina em tampão fosfato
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase
<i>PEG1</i>	“Paternally expressed 1”
<i>PEG11</i>	“Paternally expressed 11”
PGF-2α.....	Prostaglandina F2α
<i>PGK</i>	“Phosphoglycerate kinase”
PHE.....	Penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIV.....	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PN.....	Pronúcleo
PNf.....	Pronúcleo feminino
PNm.....	Pronúcleo masculino
PVA.....	Álcool polivinílico
RNA.....	Ácido ribonucléico
RNAm.....	RNA mensageiro
RT-PCR.....	Transcrição reversa por PCR
S.....	Estrôncio

SB.....	Solução de bloqueio
SAS.....	“Statistical analysis system”
SCNT.....	Transferência nuclear de célula somática
SFB.....	Soro fetal bovino
SOD.....	“Superoxide dismutase”
SOF.....	Fluido sintético do oviduto
SOX.....	“Sarcosine oxidase”
TALP.....	“Tyrode’s Albumin Lactate and Pyruvate”
TBE.....	Tris-borato-EDTA
TCM 199.....	“Tissue culture medium 199”
TE.....	Produzido <i>in vivo</i>
TNF.....	Fator de necrose tumoral
TP.....	Transferência pronuclear
TP-FIV.....	Grupo controle FIV da transferência pronuclear
TP-ID.....	Grupo controle ID da transferência pronuclear
TP-IS.....	Grupo controle IS da transferência pronuclear
χ^2	Qui-quadrado
XIST.....	“X-inactive specific transcript”

INTERAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMÁTICA EM EMBRIÕES E EXPRESSÃO DE GENES “IMPRINTED” EM FETOS BOVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO*, *IN VITRO* E PARTENOGENÉTICOS

RESUMO – Objetivamos investigar maturação, fecundação e desenvolvimento *in vitro*, e ativação artificial de oócitos bovinos, por estudos de interação núcleo-citoplasmática e expressão gênica. Observamos que a seleção morfológica dos oócitos não afetou a maturação nuclear (78,4-87,8%) e citoplasmática avaliada pelos grânulos corticais (67,2-79,3%). Por acompanhamento da dinâmica nuclear e de microtúbulos após a fecundação (FIV), verificamos que a penetração do espermatozóide ocorreu após 4h da inseminação; a diferenciação dos pronúcleos (PN) masculino e feminino pelo tamanho foi possível de 14 a 18h; a singamia ocorreu a partir de 24h; e o período de 10h pode ser suficiente para que a FIV seja efetiva em bovinos. A transferência pronuclear permitiu a observação da interação entre núcleo (N) e citoplasma (C) de zigotos ativados por ionomicina associada a estrôncio (S) ou 6-DMAP (D) por meio das taxas de clivagem e desenvolvimento até oito células e blastocisto: CSND (76,5; 36,4 e 6,8%) e CDNS (69,5; 25,0 e 4,9%). Evidenciamos efeito de citoplasma S sobre núcleo D e aumento do bloqueio embrionário entre os estádios de duas e oito células pela combinação de citoplasma e núcleo de tratamentos de ativação diferentes. Recuperamos fetos partenogenéticos D, um pouco menores, com membranas cório-alantóide de aparência normal, aos 35 dias de gestação, nos quais observamos expressão “imprinted” de *IGF2*, mas expressão materna de *XIST*, nos tecidos extra-embrionários. O cultivo *in vitro* aumentou a expressão de *IGF2*, *H19* e a relação *IGF2/IGF2r*, em embriões FIV comparados a produzidos *in vivo*.

Palavras-Chave: Classificação oocitária, Desenvolvimento embrionário, “Genomic imprinting”, Partenogênese, RT-PCR, Transferência pronuclear

**NUCLEAR-CYTOPLASMIC INTERACTION IN EMBRYOS AND EXPRESSION OF
IMPRINTED GENES IN *IN VIVO* AND *IN VITRO* PRODUCED AND
PARTHENOGENETIC BOVINE FETUSES**

ABSTRACT – We aimed to evaluate events involved in *in vitro* maturation, fertilization and development, and parthenogenetic activation of bovine oocytes assessed by nuclear-cytoplasmic interaction and gene expression. Oocyte morphological selection did not affect nuclear maturation (78.4-87.8%) and cytoplasmic cortical granule distribution (67.2-79.3%). Following nuclear and microtubular dynamics after fertilization (IVF), we observed sperm penetration 4h after insemination; male and female pronuclei differentiation by size from 14 to 18h; syngamy after 24h; and sufficient co-incubation of spermatozoa and oocytes for 10h. Pronuclear transfer to study the interaction between nucleus (N) and cytoplasm (C) in parthenogenetic embryos produced by ionomycin followed by strontium (S) or 6-DMAP (D) was assessed by cleavage, eight-cell, and blastocyst development rates: CSND (76.5, 36.4, and 6.8%) and CDNS (69.5, 25.0, and 4.9%). S cytoplasm promoted dominant effect on D nucleus. Higher rates of developmental arrest up to the eight-cell stage were observed by the combination of cytoplasm and nucleus produced by the two different activation treatments. We recovered parthenogenetic D fetuses on Day 35, which were small but normal in formation and in appearance of chorio-alantoic membranes. Genomic imprinting of *IGF2* was observed, but *XIST* was maternally expressed in extra-embryonic tissues. *In vitro* culture promoted higher expression of *IGF2* and *H19* genes and also increased *IGF2/IGF2r* ratio in IVF embryos compared to *in vivo* produced ones.

Keywords: Embryonic development, “Genomic imprinting”, Oocyte morphological classification, Parthenogenesis, Pronuclear transfer, RT-PCR

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Introdução

As biotecnologias da reprodução são ferramentas úteis para a multiplicação de animais geneticamente superiores, uma vez que favorecem o melhoramento genético, encurtam o intervalo entre gerações e, assim, aumentam a produtividade de rebanhos e a produção de alimentos de origem animal. Algumas biotécnicas promovem a disseminação de material genético de machos, como a inseminação artificial, enquanto outras aproveitam o potencial das fêmeas, como a transferência de embriões e a aspiração folicular guiada por ultra-som (OPU) seguida pela produção *in vitro* (PIV) de embriões. Por outro lado, algumas beneficiam ambos os sexos, como a PIV com gametas de animais superiores, inclusive com sêmen sexado, e a clonagem. Além de ferramenta para o melhoramento, as biotecnologias reprodutivas são utilizadas para produção de biofármacos e órgãos para xenotransplantes, manutenção ou restabelecimento de animais de alto valor ou em extinção e compreensão de eventos e correção de falhas que ocorrem durante o desenvolvimento.

Apesar da extensa utilização e ampla aplicação, algumas biotécnicas apresentam efeitos indesejáveis, como baixa eficiência, elevada incidência de distúrbios do crescimento e desenvolvimento e alta mortalidade embrionária, fetal e peri-natal. Essas falhas são provocadas por condições inadequadas de cultivo e utilização de gametas imaturos ou de baixa qualidade, que predispõem a morte celular, anormalidades cromossômicas e alterações em expressão gênica.

Nesse sentido, este trabalho busca compreender eventos e encontrar soluções para dificuldades encontradas nos diferentes procedimentos relacionados à produção *in vitro* de embriões e à micromanipulação de gametas e embriões.

Revisão de literatura

Maturação *in vitro*

Na maioria dos mamíferos, algumas horas antes da ruptura do folículo e ovulação, o oócito, totalmente crescido, reinicia a meiose e progride do estágio de Vesícula Germinativa (GV) da Prófase da primeira divisão meiótica (Prófase I) até a Metáfase da segunda divisão (Metáfase II – MII). Esse processo, denominado maturação, inclui todos os eventos necessários para que o oócito expresse seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação. A retomada da meiose é desencadeada, *in vivo*, pela onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante (LH) e é caracterizada por ruptura da vesícula germinativa (GVBD), desaparecimento do nucléolo, condensação dos cromossomos, extrusão do primeiro corpúsculo polar, formação do segundo fuso meiótico, síntese protéica ativa e expansão das células do *cumulus* (GORDON, 1994; HE et al., 1997).

Na produção *in vitro* de embriões (PIV), os oócitos são coletados em GV e, para que alcancem o estágio de MII, devem ser submetidos à maturação *in vitro* (MIV). No entanto, os oócitos aspirados são bastante heterogêneos e, conseqüentemente, a seleção dos mesmos beneficia os procedimentos de PIV. Além da qualidade dos oócitos, vários outros fatores podem influenciar a eficiência da MIV, como fase do ciclo estral, tamanho e estágio do folículo, meio de cultivo e suplementos utilizados (hormônios, aminoácidos, fontes protéicas, fatores de crescimento, fontes energéticas, antioxidantes, citocinas, vitaminas), tipo celular em co-cultivo, atmosfera gasosa, entre outros (AVELINO, 2000; FARIN et al., 2001). Uma vez que, no oócito em maturação, há acúmulo de fatores maternos imprescindíveis para a manutenção do embrião até o estágio de ativação do genoma embrionário (MEIRELLES et al., 2004), falhas na MIV comprometem o desenvolvimento posterior e afetam, assim, os sistemas de PIV.

A maturação nuclear é mais facilmente atingida que a citoplasmática, visto que ocorre espontaneamente após a liberação do oócito do interior do folículo (RICHARD e SIRARD, 1996). Do mesmo modo, modificações no núcleo são claramente observadas no oócito em maturação, enquanto que no citoplasma são muito menos evidentes. A

maturação citoplasmática envolve redistribuição das organelas intracelulares (migração das mitocôndrias para localização perinuclear e dos grânulos corticais para a periferia) e eventos moleculares, como recrutamento de RNA materno e maturação de mecanismos de liberação de cálcio (GORDON, 1994; HE et al., 1997).

Dentre as organelas citoplasmáticas do oócito, destacam-se os grânulos corticais (GC), grânulos secretórios que são liberados após a fecundação, promovem reação cortical, ou seja, modificação dos receptores e endurecimento da zona pelúcida, e previnem a polispermia (CHERR et al., 1988). A distribuição dos GC modifica-se durante o desenvolvimento oocitário e, por isso, pode ser utilizada como indício de maturação citoplasmática. Nos oócitos em GV, os GC estão distribuídos em “clusters” por todo o citoplasma; após a maturação, em MII, os GC estão dispostos na periferia, abaixo da membrana vitelínica; e, após a fecundação, os GC são liberados e quase nenhum GC é observado nos zigotos (DUCIBELLA et al., 1988; HOSOE e SHIOYA, 1996; CONNORS et al., 1998).

Os oócitos maturados são mantidos no estágio de MII devido à presença, em altos níveis, das seguintes cinases: fator promotor de Metáfase (MPF) e proteína ativada por mitógeno (MAP), que se associam aos fusos de meiose e fosforilam diversas proteínas, dentre elas, as lâminas nucleares e as histonas H1. Essas fosforilações promovem ruptura da membrana nuclear e manutenção da cromatina condensada (MEIJER e PONDAVEN, 1988; VERLHAC et al., 1994; YANG et al., 1994; HOMA, 1995). Assim, para que o oócito em MII retome o desenvolvimento, é necessária a ativação pelo espermatozóide (fecundação) ou por algum estímulo artificial (ativação partenogenética) (KÜPKER et al., 1998).

Fecundação *in vitro* e ativação partenogenética

A ativação do oócito é promovida por alterações na concentração de cálcio intracelular e por diminuição da atividade do MPF e da MAP, e culmina com exocitose dos grânulos corticais, endurecimento da zona pelúcida, bloqueio à polispermia, retomada da meiose, extrusão do segundo corpúsculo polar, formação dos pronúcleos e início das mitoses (clivagens) (WHITE e YUE, 1996; KÜPKER et al., 1998).

Na fecundação natural, a seleção dos espermatozóides capazes ocorre, principalmente, durante o trajeto através do trato reprodutivo feminino (SAACKE et al., 2000). Desse modo, para o sucesso da fecundação *in vitro* (FIV), cuidados devem ser tomados para a preparação adequada dos gametas e das condições de cultivo. Para a fecundação ocorrer, os espermatozóides devem ser móveis e hábeis a sofrer capacitação e reação acrossomal (SAACKE et al., 2000) para haver ligação à zona pelúcida e à membrana vitelínica, fusão ao oolema e incorporação ao oócito. Conseqüentemente, na FIV, o sêmen deve ser submetido à lavagem e seleção em meio com elevada força iônica, constituído por fatores como heparina, cafeína, penicilamina, hipotaurina e epinefrina. Além disso, a FIV também é influenciada pelo touro e pela partida de sêmen, assim como pela interação touro-vaca (MARQUANT-LEGUIENNE e HUMBLLOT, 1998; SAACKE et al., 2000).

Em relação à ativação artificial, vários tratamentos já foram utilizados e, dentre eles, alguns permitem o aumento de cálcio intracelular, como estrôncio (CUTHBERTSON et al., 1981), ionomicina, etanol (LOI et al., 1998) e eletrochoque (VITULLO e OZIL, 1992), enquanto outros inibem a síntese protéica, como cicloheximide (NUSSBAUM e PRATHER, 1995), ou a fosforilação de proteínas específicas, como 6-dimetilaminopurina (6-DMAP; SUSKO-PARRISH et al., 1994). Entretanto, nenhum tratamento artificial é capaz de mimetizar todos os eventos desencadeados pela fecundação (NAKADA e MIZUNO, 1998).

Após a fecundação ou ativação, há retomada da meiose e formação dos pronúcleos e, nessa fase do desenvolvimento, podem ser aplicadas as biotécnicas de injeção pronuclear, para produção de animais transgênicos, e de transferência pronuclear.

Transferência pronuclear

No momento da fecundação, o espermatozóide promove alterações morfológicas e bioquímicas no interior do oócito e desencadeia retomada da meiose e início do desenvolvimento embrionário. A fecundação une dois gametas com diferentes características celulares e moleculares, e a cooperação entre os dois é necessária para

que se tornem juntos um genoma embrionário e formem um novo indivíduo (HAN et al., 2005). Dessa maneira, há modificação mútua dos genomas materno e paterno, com conseqüente alteração em “imprints” parentais, remodelação dos cromossomos, desmetilação global do genoma (ativa nos espermatozóides e passiva nos oócitos) e substituição de protaminas espermáticas por histonas (MOORE e REIK, 1996; MANN e BARTOLOMEI, 2002). Esses eventos são essenciais para o desenvolvimento posterior do embrião e, em sua maioria, são condicionados por fatores presentes no citoplasma do oócito.

Uma vez que a interação entre os genomas materno e paterno e o citoplasma ocorre imediatamente após a fecundação, as modificações decorrentes podem ser estudadas pela transferência pronuclear entre zigotos. Por meio dessa técnica, é possível avaliar a influência da interação núcleo-citoplasmática sobre o desenvolvimento embrionário (McGRATH e SOLTER, 1986), os mecanismos de herança mitocondrial (MEIRELLES e SMITH, 1997) e os efeitos de componentes do citoplasma materno na expressão de características fenotípicas (WESTHUSIN e De AZAMBUJA, 1996). Além disso, a transferência pronuclear é utilizada em procedimentos de reclonagem ou transferência nuclear seriada (PEURA e TROUNSON, 1998), visando melhorar a reprogramação do núcleo transferido, e para a produção de embriões gino e androgenéticos, por meio da troca de pronúcleos feminino e masculino entre zigotos (HAGEMANN et al., 1998), em estudos de “genomic imprinting”.

“Genomic imprinting”

O desenvolvimento embrionário inicia-se com a união dos gametas masculino e feminino e, visto que cada um dos genitores contribui com um conjunto haplóide de cromossomos para seus descendentes, parecia óbvio supor que a contribuição genética transmitida por ambos os pais deveria ser idêntica. Entretanto, experimentos, em camundongos transgênicos e portadores de translocações cromossômicas (KENDREW, 1994; RUVINSKY, 1999) e em embriões parteno/ginogenéticos e androgenéticos (SOLTER, 1988), demonstraram que a expressão de alguns genes é influenciada pela sua origem parental (materna ou paterna). Esse evento, denominado

“genomic imprinting”, ocorre somente em mamíferos eutérios e é explicado pelas teorias do conflito entre genes maternos e paternos durante a gestação; do potencial de evolução dos genomas; da prevenção de doenças malignas do trofoblasto e do bloqueio à partenogênese (KENDREW, 1994; RUVINSKY, 1999; SWALES e SPEARS, 2005).

Aproximadamente, 50 genes “imprinted” já foram identificados em humanos e 80, em camundongos. No entanto, poucos genes foram observados nas espécies de produção, 11 em ovinos (*GTL2*, *DLK1*, *DAT*, *PEG11*, *PEG1*, *MEST*, *MEG8*, *IGF2*, *H19* e *IGF2r*), 5 em bovinos (*IGF2r*, *IGF2*, *XIST*, *GTL2* e *H19*) e 2 em suínos (*IGF2* e *IGF2r*) (DINDOT et al., 2004; ZHANG et al., 2004). Uma vez que o “genomic imprinting” está relacionado ao mecanismo de nutrição do feto a partir de tecidos maternos e que diferenças na expressão de genes envolvidos no desenvolvimento da placenta já foram detectadas entre camundongos e bovinos (HALL et al., 2005), novos estudos devem ser desenvolvidos em espécies com placentas de tipos diferentes de humanos e roedores, como os ruminantes.

A maioria dos genes “imprinted” é expressa, exclusivamente, nos estádios embrionário e neonatal ou codificam seus principais efeitos fenotípicos nessas fases (MOORE, 2001). Dentre as funções desempenhadas pelos genes “imprinted”, destacam-se: regulação do crescimento fetal, por *IGF2*, *IGF2r* e *H19* (WATSON et al., 1992; KENDREW, 1994; SASAKI et al., 1995; DEAN, et al., 1998); suprimento sanguíneo e formação da placenta, por *IGF2r*, *INS2* e *MASH2* (LOI et al., 1998; YOUNG e FAIRBURN, 2000); inativação do cromossomo X, pelo *XIST* (YOUNG e FAIRBURN, 2000); supressão de tumores, pelo *H19* (SASAKI et al., 1995); memória celular (KENDREW, 1994); expressão de hormônios e produtividade animal (RUVINSKY, 1999).

Apesar da expressão preferencial por um dos alelos parentais, há genes “imprinted” que apresentam expressão bialélica em alguns tecidos somáticos, assim como em algumas fases do desenvolvimento embrionário, fetal e pós-natal. Na maior parte das espécies estudadas, a expressão do *XIST* é “imprinted” no trofoblasto e aleatória, nos demais tecidos (WRENZYCKI et al., 2002). Em camundongos, o gene

INS2 é “imprinted” na placenta, mas não no pâncreas; o *IGF2* é “imprinted” no mesoderma, endoderma fetal e placenta, mas ambos os alelos são expressos no cérebro e sistema nervoso central (KENDREW, 1994; YOUNG e FAIRBURN, 2000); a expressão do *H19* pode ser bialélica até o estágio de blastocisto (SASAKI et al., 1995) e o *MASH2* é expresso na massa celular interna do blastocisto, mas se torna específico do trofoblasto após a implantação (ROSSANT et al., 1998). Em ovinos, a expressão do *IGF2* passa a ser bialélica no fígado, após o nascimento (McLAREN e MONTGOMERY, 1999). Assim, os genes “imprinted” são tecido e estágio específicos.

Esse mecanismo é de extrema importância para a vitalidade do organismo e realização plena de suas funções, e o “imprinting” anômalo pode acarretar falhas no desenvolvimento e crescimento embrionário, bem como surgimento de doenças em humanos e animais.

Falhas em biotécnicas da reprodução

As falhas de crescimento e desenvolvimento ocorrem naturalmente, mas em pequena escala, em todas as espécies de mamíferos. Entretanto, o uso de biotecnologias com a finalidade de reprodução assistida, obtenção de indivíduos superiores ou produção de fármacos, tem aumentado a incidência das anormalidades.

Em humanos, a utilização de tecnologias de reprodução assistida (ARTs) elevou a quantidade de defeitos ao nascimento, tais como alterações placentárias e baixo peso, de 4,2% para 8,6% com a utilização de injeção espermática intra-citoplasmática (ICSI) e para 9,0%, com a FIV (THOMPSON et al., 2001; GOSDEN et al., 2003). Além disso, as ARTs aumentaram em 4,2 vezes o aparecimento de desordens genéticas raras, como a Síndrome de Beckwith-Wiedemann (GOSDEN et al., 2003).

Em bovinos, somente 30-40% do oócitos maturados *in vitro* atingem o estágio de blastocisto (MEIRELLES et al., 2004); dos blastocistos transferidos, um número variável (cerca de 30-50%) progride a termo, com o nascimento de até 20% de bezerros com anormalidades (GALLI et al., 2003; HOSHI, 2003). Além disso, só 7-14% dos embriões submetidos à transgênese por injeção pronuclear incorporam e transmitem aos descendentes o gene de interesse (WALL, 2001), e, no máximo, 10% dos embriões

clonados nascem (YANG et al., 2005). A utilização de soro durante o cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* e clonados foi responsabilizada pela Síndrome do Bezerro Gigante (LOS), caracterizada por crescimento fetal aumentado, placentomegalia, elevado peso ao nascimento, morte fetal e p ri-natal e anormalidades orgânicas e esqueléticas (MOORE e REIK, 1996; YOUNG e FAIRBURN, 2000; THOMPSON et al., 2001).

As possíveis causas das falhas relacionadas às biotécnicas são condições inadequadas de cultivo com deficiência de metabólitos e/ou excesso de espécies reativas de oxig nio e de fatores prejudiciais, como o fator de necrose tumoral (TNF; BETTS e KING, 2001),  l m da utilização de gametas imaturos ou de baixa qualidade (RYCKE et al., 2002). Esses eventos podem desencadear morte celular, anormalidades cromoss micas, aneuploidias, encurtamento dos telômeros e senescência (BETTS e KING, 2001) e alterações na expressão de genes específicos.

Alterações na expressão gênica

Uma das causas da baixa eficiência das biotécnicas da reprodução é a expressão desbalanceada de genes importantes para o desenvolvimento. Vários genes com expressão alterada já foram identificados em bovinos produzidos *in vitro*, tais como genes ligados ao X: *G6PD* e *PGK* (WRENZYCKI et al., 2002),   apoptose e ao “stress” térmico e oxidativo: *Hsp70.1*, *BAX*, *SOD* e *SOX*; ao transporte de glicose: *Glut-3* e *Glut-4*;   comunicação celular: *Cx43* e *Cx31*,   diferenciação: *LIF*, *LR- * (LAZZARI et al., 2002; RIZOS et al., 2002), genes “imprinted” (MOORE e REIK, 1996; YOUNG e FAIRBURN, 2000) e DNA metiltransferases (RYCKE et al., 2002).

Uma vez que o estabelecimento de “imprints”, por metilação de DNA, ocorre somente nas células germinativas primordiais (SURANI, 2001), enquanto os demais genes, em bovinos, sofrem desmetilação global entre a fecundação e o estádio de 8 a 16 células (REIK et al., 2001), os genes “imprinted” podem ser mais susceptíveis que os demais às influências durante o período de pr -implantação (MOORE e REIK, 1996).  l m disso, na clonagem, um pré-requisito para o sucesso da transferência nuclear de célula somática é que o padrão de metilação somático da célula doadora seja apagado

e transformado em padrão embrionário sem que os “imprints” sejam removidos durante essa reprogramação (JAENISCH, 1997; MOORE, 2001).

Assim, a intensa manipulação dos embriões durante os procedimentos de clonagem, transgênese, maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, além de exposição a diferentes temperaturas, atmosferas e meios de cultivo podem afetar o “imprinting” (DEAN et al., 1998; KONO, 1998; YOUNG e FAIRBURN, 2000). Em camundongos, o meio Whitten promoveu expressão bialélica do *H19* no trofoblasto, enquanto os embriões cultivados em meio KSOM+aa comportaram-se como os produzidos *in vivo* (DOHERTY et al., 2000). Já, em bovinos, o cultivo em TCM 199 com soro de vaca em estro, promoveu aumento da expressão de *IGF2r* em blastocistos, comparado a meio SOF com PVA (YASEEN et al., 2001). Em ovinos, o cultivo *in vitro* acarretou em redução de 30-60% na expressão de *IGF2r* (YOUNG et al., 2001).

Em camundongos clonados a partir de células tronco-embrionárias e adultas diferenciadas, também já foram descritas alterações na expressão de genes “imprinted” (HUMPHERYS et al., 2001; INOUE et al., 2002). Em clones bovinos nati-mortos, foi observada expressão bialélica do gene *H19* tanto nos clones quanto nas células doadoras de núcleo (ZHANG et al., 2004). Além disso, a expressão do gene *XIST* foi mais afetada em clones de células adultas do que de células fetais (WRENZYCKI et al., 2002).

Atualmente, os principais obstáculos para o estabelecimento, em larga escala, de programas de produção *in vitro* de embriões bovinos e clonagem, têm sido as altas taxas de mortalidade embrionária e fetal e a elevada ocorrência de anomalias nos animais nascidos. Conseqüentemente, o estudo do “genomic imprinting” pode fornecer subsídios para a compreensão das falhas e da baixa eficiência, que, recentemente, ocorrem nos programas de biotecnologia com embriões, permitindo controlar a disseminação de indivíduos anômalos, gerados pelas atuais biotecnologias, e melhorar a eficiência e a segurança desses procedimentos.

Contextualização da pesquisa

As pesquisas realizadas em universidades e centros de pesquisas, no Brasil, acompanham o progresso mundial e contribuem para as diversas biotecnologias da reprodução. A presente tese está no contexto de inúmeras linhas de pesquisa da área de Reprodução Animal desenvolvidas desde o final da década de 70, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Jaboticabal – SP.

Na FCAV, experimentos de produção *in vitro* (PIV) de embriões foram iniciados em 1985, padronizados em camundongos e, posteriormente, aplicados em bovinos, cujo primeiro nascimento ocorreu em 1994. Para o aprimoramento da PIV, em bovinos, foram realizados diversos testes para o estabelecimento de meios, suplementos, condições atmosféricas e técnicas de cultivo, nas três etapas da PIV: maturação, fecundação e cultivo (MIKICH et al., 1986; GARCIA et al., 1988; WATANABE, 1993; MINGOTI, 1995, 2000; COELHO, 1997; QUETGLAS, 1997; AVELINO, 2000, 2004; BARRETTO, 2003; DIAS, 2003; ANCIOTO, 2004; LO TURCO, 2004; SORIA, 2005; WOLF, 2005). Nas diferentes pesquisas, foram avaliadas taxas de maturação e de desenvolvimento, qualidade da PIV, viabilidade dos embriões e incidência de apoptose, buscando, assim, melhorar os sistemas de cultivo *in vitro*.

Os camundongos também serviram de modelo experimental para compreensão de eventos do desenvolvimento pré e pós-implantação, estabelecimento de técnicas de enucleação química de oócitos e produção de animais quimeras. Para tanto, foi necessário o estabelecimento e o aprimoramento das técnicas de cultivo celular, que tornou possível a produção e o cultivo de células tronco-embriônicas bovinas (WOLF, 2000) e murinas, inclusive transgênicas (BUCK, 2003), e fibroblastos, utilizados tanto como monocamadas suporte, quanto como doadores de núcleo, na clonagem.

Após o domínio da PIV e do cultivo celular, foi possível a realização da clonagem por transferência nuclear de célula somática (SCNT). Para tanto, foram estudadas técnicas de sincronização de ciclo celular, enucleação de oócito, transferência e injeção

nuclear (YAMAZAKI, 2001), eletrofusão e ativação oocitária (MÉO, 1999, 2002). Isso culminou com o nascimento da bezerra Penta, o primeiro clone de animal adulto produzido no Brasil, em julho de 2002 (YAMAZAKI et al., 2002). Entretanto, de maneira semelhante a relatos de clones obtidos em todo o mundo, a bezerra Penta apresentou vários problemas após o nascimento e faleceu em um mês por septicemia e peritonite (YAMAZAKI et al., 2005).

Nesse contexto, diversos experimentos são, atualmente, conduzidos na área de micromanipulação de embriões, para estudos em clonagem, herança mitocondrial (FERREIRA, 2002) e interação núcleo-citoplasmática, e de biologia molecular, para sexagem de embriões, produção de animais transgênicos e avaliação de expressão gênica e segregação mitocondrial. Em continuidade às pesquisas realizadas durante a iniciação científica (MÉO, 1999) e o mestrado (MÉO, 2002), buscou-se melhor compreender os eventos envolvidos na maturação, fecundação e desenvolvimento *in vitro*, e na ativação artificial de oócitos bovinos por meio de coloração de grânulos corticais e avaliação de dinâmica de microtúbulos e cromatina, interação núcleo-citoplasmática e expressão de genes “imprinted”.

Objetivos

Objetivo geral

Investigar eventos envolvidos na maturação, fecundação e desenvolvimento *in vitro*, e na ativação artificial de oócitos bovinos, por meio de estudos de interação núcleo-citoplasmática e de expressão gênica.

Objetivos específicos

Avaliar a qualidade da maturação *in vitro*, nas condições de estudo, por coloração de cromatina e grânulos corticais, como indício de maturação citoplasmática.

Acompanhar a dinâmica nuclear e de microtúbulos após fecundação *in vitro*, por imunofluorescência de tubulina e coloração de cromatina, visando aumentar as

informações sobre os eventos desencadeados pela fecundação e identificar o momento adequado para a visualização dos pronúcleos e para a diferenciação entre os pronúcleos masculino e feminino.

Padronizar e utilizar a técnica de transferência pronuclear entre embriões bovinos ativados, com ionomicina seguida de estrôncio ou 6-DMAP, para estudo dos efeitos da interação núcleo-citoplasmática sobre o desenvolvimento e o bloqueio do desenvolvimento pré-implantação dos embriões reconstituídos.

Verificar a ocorrência de “imprinting” dos genes *IGF2*, *XIST* (expressos paternos), *IGF2r*, *MASH2* e *H19* (maternos), em fetos e membranas cório-alantóide obtidos aos 35-36 dias de gestação de embriões bovinos produzidos *in vivo*, *in vitro* e partenogenéticos ativados com ionomicina seguida de estrôncio ou 6-DMAP; e avaliar os efeitos do cultivo *in vitro*.

CAPÍTULO 2 – MATURAÇÃO NUCLEAR, DISTRIBUIÇÃO DE GRÂNULOS CORTICAIS E DINÂMICA DA FECUNDAÇÃO *IN VITRO* E DA FORMAÇÃO DE PRONÚCLEOS EM BOVINOS

Título

Maturação Nuclear, Distribuição de Grânulos Corticais e Dinâmica da Fecundação *in Vitro* e da Formação de Pronúcleos em Bovinos

Resumo

RESUMO – A maturação oocitária é marcada pela retomada da primeira divisão da meiose, com progressão do estágio de Vesícula Germinativa (GV) da Prófase I até a Metáfase II (MII), e inclui todos os eventos necessários para que o oócito expresse seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação. Para avaliarmos a eficiência da maturação *in vitro* (MIV), utilizamos oócitos classificados em viáveis (graus I, II e III) e inviáveis (atrésico e desnudo), e acompanhamos a progressão nuclear e a distribuição dos grânulos corticais (GC) como indicio de maturação citoplasmática, após MIV em TCM 199 com soro fetal bovino, hormônios, antibiótico e piruvato, por 24h em 5% de CO₂ em ar. Maturação nuclear (78,4-87,8%) e citoplasmática (GC periféricos; 67,2-79,3%) foram semelhantes entre as diferentes classes de oócitos e apresentaram-se como eventos independentes. Para o acompanhamento dos eventos desencadeados pelo espermatozóide, avaliamos a dinâmica nuclear e de microtúbulos, em intervalos de 2h, após fecundação *in vitro* (FIV), em meio TALP com heparina, PHE e sêmen preparado em gradiente de Percoll. Observamos que o estágio de MII foi predominante de 2 a 8h; MII e Anáfase/Telófase (A/T) predominaram às 10h; MII, A/T e estágio pronuclear (PN) de 14 a 16h; e PN a partir de 18h. A penetração do espermatozóide ocorreu após 4h da inseminação dos oócitos; a diferenciação dos PN

masculino e feminino pelo tamanho foi possível de 14 a 18h e a singamia ocorreu a partir de 24h. O período de 10h pode ser suficiente para que a FIV seja efetiva em oócitos bovinos, nas condições aqui descritas.

Palavras-Chave: Classificação oocitária, Grânulos corticais, Microtúbulos

Introdução

Na maioria dos mamíferos, algumas horas antes da ruptura do folículo e ovulação, o oócito, totalmente crescido, reinicia a meiose e progride do estágio de Vesícula Germinativa (GV) da Prófase da primeira divisão meiótica (Prófase I) até a Metáfase da segunda divisão (Metáfase II – MII). Esse processo, denominado maturação, inclui todos os eventos necessários para que o oócito expresse seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação (GORDON, 1994).

Na produção *in vitro* de embriões (PIV), os oócitos são coletados em GV e, para que alcancem o estágio de MII, devem ser submetidos à maturação *in vitro* (MIV). No entanto, os oócitos aspirados são bastante heterogêneos e, conseqüentemente, a seleção dos mesmos pode beneficiar os procedimentos de PIV (FARIN et al., 2001).

A maturação envolve eventos nucleares e citoplasmáticos. A maturação nuclear é mais facilmente atingida que a citoplasmática, visto que ocorre espontaneamente após a liberação do oócito do interior do folículo (RICHARD e SIRARD, 1996). Do mesmo modo, modificações no núcleo são claramente observadas no oócito em maturação, enquanto que no citoplasma são muito menos evidentes. A maturação citoplasmática envolve redistribuição das organelas intracelulares, como migração das mitocôndrias para localização perinuclear e dos grânulos corticais para a periferia, e eventos moleculares, como recrutamento de RNA materno e maturação de mecanismos de liberação de cálcio (GORDON, 1994; HE et al., 1997).

Dessa maneira, a coloração dos grânulos corticais pode ser utilizada como indício do estado de maturação citoplasmática dos oócitos. Nos oócitos imaturos, os GC estão distribuídos em “clusters” por todo o citoplasma; após a maturação, os GC estão dispostos na periferia, abaixo da membrana vitelínica; e, após a fecundação, os GC são liberados e quase nenhum GC é observado nos zigotos (DUCIBELLA et al., 1988; HOSOE e SHIOYA, 1996; CONNORS et al., 1998).

Os oócitos maturados permanecem no estágio de MII até o momento da ativação pelo espermatozóide (fecundação) ou por algum estímulo artificial (ativação partenogenética) (KÜPKER et al., 1998). A ativação do oócito é promovida por alterações na concentração de cálcio intracelular e por diminuição da atividade do fator promotor de Metáfase (MPF) e da proteína ativada por mitógeno (MAP), e culmina com exocitose dos grânulos corticais, endurecimento da zona pelúcida, bloqueio à polispermia, retomada da meiose, extrusão do segundo corpúsculo polar, formação dos pronúcleos e início das mitoses (clivagens) (WHITE e YUE, 1996; KÜPKER et al., 1998).

Após a fecundação, a descondensação da cromatina do espermatozóide começa antes que a do oócito e, dessa maneira, o primeiro pronúcleo a ser formado é o masculino, que, por curto período de tempo, permanece maior que o feminino, tornando possível diferenciá-los pelo tamanho (NAVARA et al., 1994; HAGEMANN et al., 1998). Posteriormente, o pronúcleo feminino atinge o tamanho do masculino, ambos migram para o centro do zigoto e sofrem singamia (NAVARA et al., 1994). Essas diferenças são importantes para a aplicação de técnicas que necessitam da visualização e da identificação dos pronúcleos. Dentre elas, a transferência pronuclear para estudo de interação núcleo-citoplasmática (McGRATH e SOLTER, 1986), herança mitocondrial (MEIRELLES e SMITH, 1997) e produção de embriões andro e ginogenéticos (HAGEMANN et al., 1998). Além da injeção pronuclear para produção de animais transgênicos (CHAN, 1999), principalmente, quando se opta pela injeção do transgene no pronúcleo masculino a fim de aumentar as chances de integração.

Neste experimento, por acompanhamento da maturação nuclear e da distribuição dos grânulos corticais, avaliamos a eficiência da MIV em TCM 199 com soro fetal

bovino, hormônios, antibiótico e piruvato, por 24h em 5% de CO₂ em ar, e verificamos se ela poderia ser aumentada pela utilização de oócitos de melhor qualidade segundo classificação morfológica. Além disso, por meio de imunofluorescência de tubulina e coloração de cromatina, acompanhamos a dinâmica nuclear após a FIV, com objetivo de melhor compreender os eventos desencadeados pela fecundação e identificar o momento preciso de visualização e distinção dos pronúcleos masculino e feminino.

Material e Métodos

Coleta de oócitos e maturação *in vitro*

Ovários bovinos coletados em abatedouro foram transportados ao laboratório, em solução salina a 28-32°C, e seus folículos antrais com diâmetro de 3 a 7mm foram aspirados por agulha de 18-G adaptada à seringa de 20mL. O fluido folicular aspirado foi transferido para tubo cônico de 50mL e decantado por 15min para a separação dos oócitos. Posteriormente, o sedimento foi transferido para placa de Petri e visualizado em microscópio estereoscópico.

Os oócitos foram selecionados e maturados *in vitro* (MIV), em grupos de 20 a 25, dispostos em gotas de 100µL de meio de MIV, cobertas por óleo mineral (Dow Corning 200 Fluid 50CST). Para a MIV, foi utilizado o meio TCM 199 com sais de Earle (Gibco 31.100) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; inativado a 55°C por 30min), 1,0µg/mL de FSH (Pluset[®], Calier), 50µg/mL de hCG (Profasi[®], Serono), 1,0µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e 83,4µg/mL de amicacina (Biochimico), durante 24h à temperatura de 38,5-39°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Experimento I – Maturação nuclear e distribuição de grânulos corticais

Classificação morfológica dos oócitos

Antes da MIV, os oócitos selecionados foram classificados segundo LOOS et al. (1991) e LONERGAN et al. (1992), *apud* GORDON (1994), pelas características do

citoplasma e das células do *cumulus*, em grau I: *cumulus* compacto com várias camadas de células, citoplasma homogêneo e complexo *cumulus*-oócito (COC) claro e transparente; grau II: 4-5 camadas de *cumulus*, aparência irregular e zona escura na periferia do oócito; grau III: 2-3 camadas de *cumulus*, citoplasma irregular e COC escuro; atrésico: células do *cumulus* expandidas e desnudo: ausência de células do *cumulus*.

Coloração de cromatina e grânulos corticais

A coloração de cromatina e grânulos corticais foi realizada segundo metodologia descrita por CHERR et al. (1988), com algumas modificações. Após 24h de MIV, foi realizada a remoção das células do *cumulus* com 0,2% de hialuronidase (Hyalozima[®], Aspen) em PBS livre de Ca^{2+} , com 0,1% de álcool polivinílico (PVA; Sigma P-8136), em vórtex por 3min, e remoção da zona pelúcida com PBS pH 2,5. Posteriormente, os oócitos foram fixados em 3% de formaldeído (Mallinckrodt 5016), em PBS, por 30min à temperatura ambiente, e incubados a 4°C durante a noite, em solução de bloqueio – SB [PBS com 1mg/mL de albumina sérica bovina (BSA; Sigma A-6003), 100mM de glicina (Plusone 17-1323-01) e 0,2% de azida de sódio (Sigma S-2002)]. Para a permeabilização, foram tratados por 5min a 38°C em SB acrescida de 0,1% de Triton X-100 (USB 22686). Posteriormente, foram incubados em 10µg/mL de *Lens culinaris* aglutinina conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma L-9262) em SB, por 15min. Em seguida, lavados em SB por 3 vezes (5min cada), corados com 10µg/mL de Hoechst 33342 (Sigma B-2261) em SB por 10min, lavados novamente em SB, montados em lâminas e visualizados em microscópio de epifluorescência (330-385nm e 420-490nm) para avaliação da progressão nuclear e da distribuição dos grânulos corticais.

Experimento II – Dinâmica da fecundação *in vitro* e formação de pronúcleos

Neste experimento, somente oócitos de *cumulus* compacto com, no mínimo, 2 camadas de células (graus I, II e III) foram destinados à maturação e fecundação *in vitro*.

Fecundação *in vitro*

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada em gotas de 100 μ L de meio TALP-FIV [meio TALP com 10 μ g/mL de heparina (Sigma H-3149), 18 μ M de penicilamina (Sigma P-4875), 10 μ M de hipotaurina (Sigma H-1384) e 1,8 μ M de epinefrina (Sigma E-4250)], suplementado com 0,2mM de piruvato, 83,4 μ g/mL de amicacina e 6mg/mL de BSA, cobertas com óleo mineral. O sêmen, congelado em palhetas de 0,5mL, foi aquecido a 35°C por 30seg e preparado por centrifugação em gradiente de Percoll (Sigma P-4937), de 45 e 90%, a 900xg por 30min, em meio TALP-sêmen [meio TALP com 10mM de hepes ácido (J.T. Baker 4018-01)]. Foram recuperados 30 μ L do sedimento, que foram avaliados quanto ao volume, à concentração e à motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25 x 10⁶ espermatozóides vivos/mL com meio TALP-FIV. Posteriormente, 4 μ L do sêmen diluído foram adicionados às gotas contendo 20 a 25 oócitos, obtendo-se a concentração final de 1 x 10⁵ espermatozóides vivos/gota (1 x 10⁶/mL). O período de co-incubação foi de até 24h, a 38,5-39°C e 5% de CO₂ em ar, para realização de imunofluorescência de tubulina e coloração de cromatina.

Imunofluorescência de tubulina e coloração de cromatina

Utilizamos a técnica descrita por LIU et al. (1998). Após o início da FIV, os zigotos foram coletados a intervalos de 2 horas, nos momentos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24h, e incubados por 30min a 38°C em tampão estabilizador de microtúbulo [0,1M Pipes (Sigma P-1851), pH 6,9; 5mM MgCl₂.6H₂O (Merck 1.05833); 2,5mM EGTA (Sigma E-3889)] com 2% de formaldeído, 0,1% de Triton X-100, 1 μ M de taxol (Sigma T-1912), 0,01% de aprotinina (Sigma A-1153), 1mM de ditioneitol (Sigma D-9163) e 50% de óxido de deutério (Aldrich 15,188-2). Posteriormente, foram incubados durante a noite a 4°C em meio de lavagem e incubação - MLI (PBS com 0,02% de azida de sódio, 0,01% de Triton X-100, 0,2% de leite em pó desnatado, 2% SFB, 2% de BSA e 0,1M de glicina). A seguir, em MLI com anticorpo monoclonal de camundongo anti- α -tubulina (1:50) conjugado a FITC (Sigma F-2168) a 38°C por 2h. Após serem lavados em MLI, foram corados com 10 μ g/mL de Hoechst 33342 em MLI por 10min, montados

em lâmina e avaliados sob fluorescência (330-385nm e 420-490nm), quanto ao comportamento dos microtúbulos (fusos de meiose) e dos cromossomos.

Análise estatística

Os resultados de maturação nuclear e distribuição de grânulos corticais, nas diferentes classes de oócitos, no Experimento I, e de progressão nuclear, em cada momento após a fecundação, no Experimento II, foram avaliados pelo teste de χ^2 ou, quando apropriado, pelo teste Exato de Fisher, utilizando-se o SAS (Versão 8.2) e nível de significância de 5%.

Resultados

Experimento I – Maturação nuclear e distribuição de grânulos corticais

Classificação morfológica dos oócitos

Nas Figuras 1 e 2, estão demonstrados os complexos *cumulus*-oócito classificados em viáveis (graus I, II e III) e inviáveis (atrésico e desnudo) para a maturação *in vitro*.

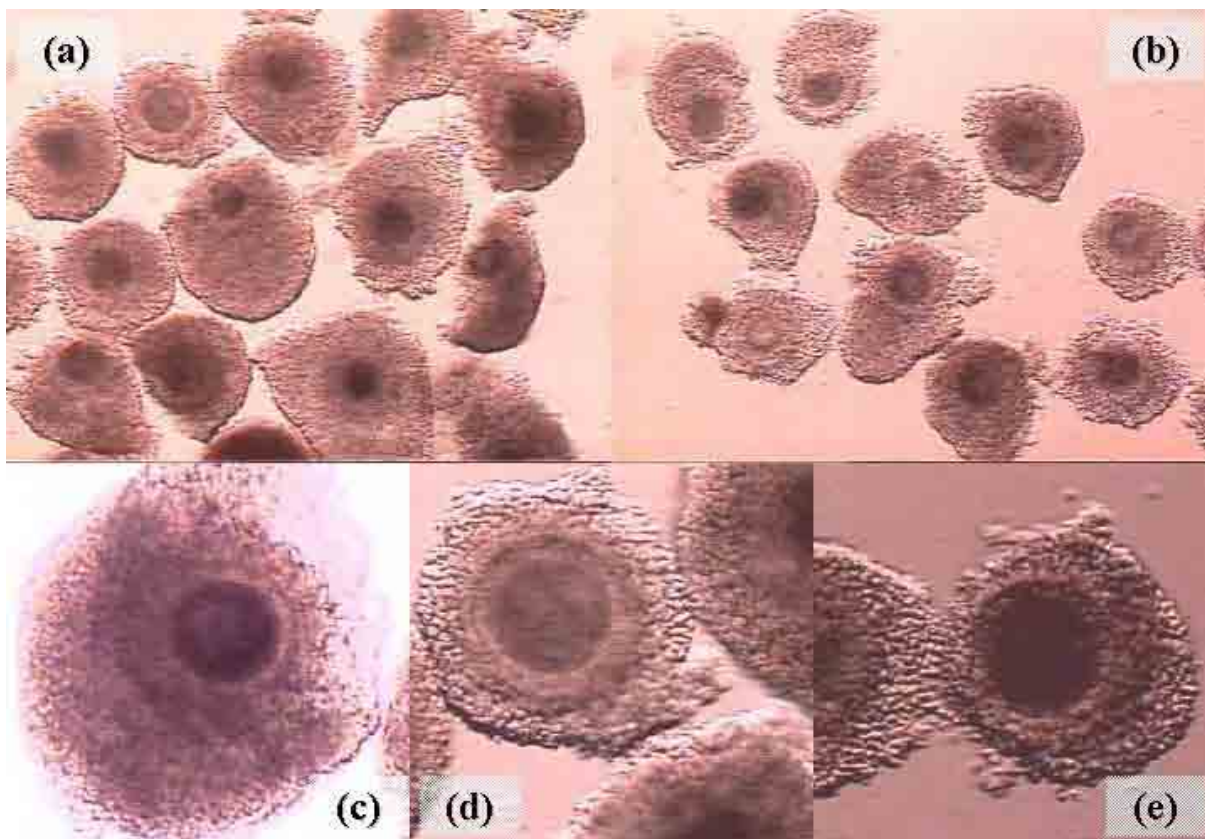


Figura 1. Classificação dos complexos *cumulus*-oócito bovinos viáveis para a maturação *in vitro*, sob microscópio estereoscópico: (a,b) Graus I, II e III; (c) grau I; (d) grau II; (e) grau III.

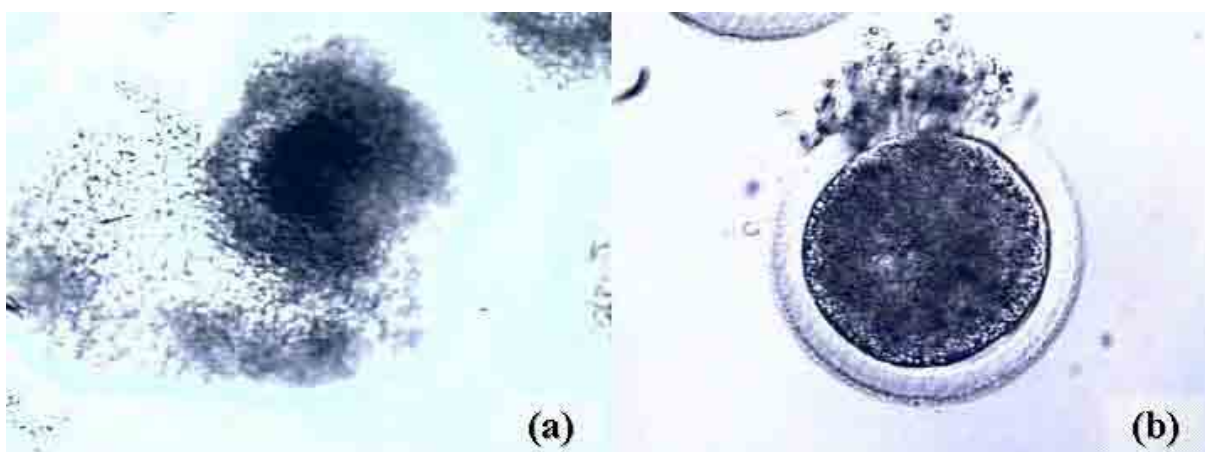


Figura 2. Classificação dos complexos *cumulus*-oócito bovinos inviáveis para a maturação *in vitro*, sob microscópio estereoscópico: (a) atrésico; (b) desnudo.

Coloração de cromatina e grânulos corticais

Após coloração, as diferentes classes de oócitos foram avaliadas de acordo com a progressão nuclear e a distribuição dos grânulos corticais (GC) (Figura 3). O núcleo dos oócitos foi classificado como maduro (em Metáfase II - MII) ou imaturo (em qualquer estágio anterior a MII). Utilizando os GC como indicio de maturação citoplasmática, os oócitos com GC em “clusters” foram classificados como imaturos; os com GC em transição do centro para a periferia, como parcialmente maduros; e os com GC na periferia, como maduros (MÉO et al., 2005).

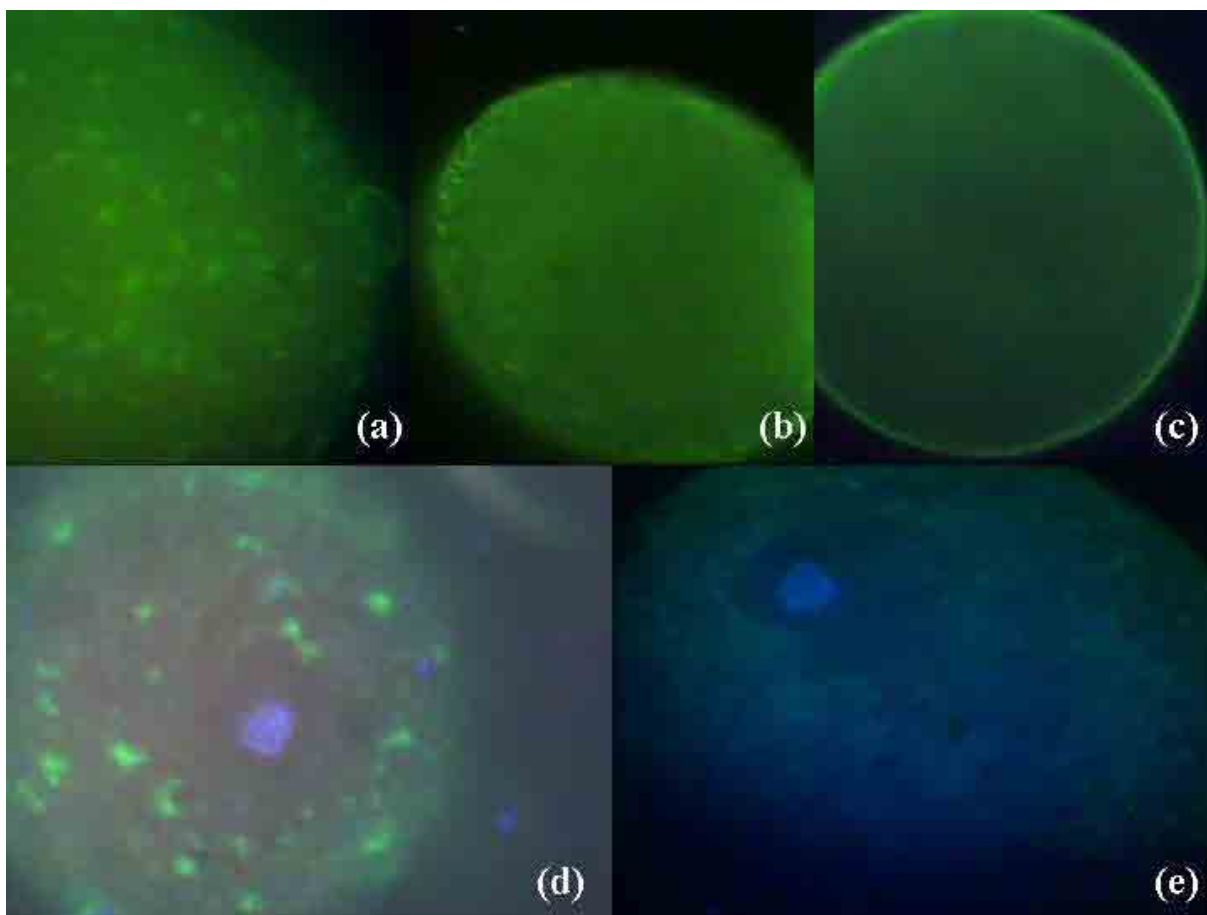


Figura 3. Distribuição dos grânulos corticais (GC) e coloração de cromatina em oócitos bovinos maturados *in vitro* por 24h, observados em microscópio de epifluorescência. (a) GC dispostos em “clusters” no interior do oócito (citoplasma imaturo); (b) GC em transição do centro para a periferia (citoplasma parcialmente maduro); (c) GC dispostos na periferia, abaixo da membrana vitelínica (citoplasma maduro); (d) oócito em Metáfase II (núcleo

maturo) e GC em “clusters” (citoplasma imaturo); (e) oócito em Metáfase II (núcleo maturo) e GC periféricos (citoplasma maturo). Verde: GC corados com 10µg/mL de *Lens culinaris* (específica à α -D-manose) conjugada a FITC por 15min. Azul: DNA corado com 10µg/mL de Hoechst 33342 por 10min.

Os resultados obtidos após coloração de cromatina e grânulos corticais para os oócitos classificados em graus I, II e III, atrésico e desnudo, foram descritos na Tabela 1. Os oócitos das cinco classes morfológicas apresentaram semelhante ($P>0,05$) maturação nuclear (estádio de MII; 78,4-87,8%) e distribuição dos grânulos corticais: em “clusters” (3,6-15,7%), em transição (11,8-27,6%) e periféricos (67,2-79,3%). Quando comparamos a proporção de Metáfase II à de GC periféricos, observamos que, nos oócitos de mesma classificação morfológica, a maturação nuclear foi semelhante ($P>0,05$) à citoplasmática (GC periféricos), respectivamente: 78,4 e 72,5%, em grau I, 79,5 e 67,2%, em grau II, 87,8 e 79,0%, em grau III, 80,8 e 79,3%, em atrésico e 83,3 e 70,9%, em desnudo.

Tabela 1. Proporção (porcentagem) de oócitos bovinos em Metáfase II e nas classes de distribuição de grânulos corticais (GC) após classificação morfológica dos oócitos em graus I, II e III, atrésico e desnudo e maturação *in vitro* por 24h.

	Metáfase II	GC em “Clusters”	GC em Transição	GC Periféricos
Grau I	40/51 (78,4)	8/51 (15,7)	6/51 (11,8)	37/51 (72,5)
Grau II	31/39 (79,5)	3/58 (5,2)	16/58 (27,6)	39/58 (67,2)
Grau III	36/41 (87,8)	5/62 (8,1)	8/62 (12,9)	49/62 (79,0)
Atrésico	21/26 (80,8)	3/58 (5,2)	9/58 (15,5)	46/58 (79,3)
Desnudo	40/48 (83,3)	2/55 (3,6)	14/55 (25,5)	39/55 (70,9)

Valores sem sobrescritos nas colunas e linhas (entre Metáfase II e GC periféricos) são semelhantes ($P>0,05$).

Na Tabela 2, foi demonstrada a porcentagem de maturação nuclear (MII), nos oócitos, de acordo com a classificação morfológica e de distribuição de grânulos corticais. Não foram observadas diferenças significativas ($P>0,05$) na quantidade de oócitos maduros (em estágio de MII) em cada classe de oócitos (graus I, II e III, atrésico e desnudo) e de grânulos corticais (GC em “clusters”, em transição e periféricos).

Tabela 2. Proporção (porcentagem) de maturação nuclear (Metáfase II) em oócitos bovinos de acordo com classificação morfológica e de distribuição dos grânulos corticais (GC), após maturação *in vitro* por 24h.

	Metáfase II				
	Grau I	Grau II	Grau III	Atrésico	Desnudo
GC “clusters”	6/8 (75,0)	0/1 (0,0)	2/2 (100)	-	-
GC transição	4/6 (66,7)	6/10 (60,0)	5/6 (83,3)	5/6 (83,3)	12/12 (100,0)
GC periféricos	30/37 (81,1)	25/28 (89,3)	29/33 (87,9)	16/20 (80,0)	28/36 (77,8)

Valores sem sobrescritos nas coluna e linhas são semelhantes ($P>0,05$).

Experimento II – Dinâmica da fecundação *in vitro* e formação de pronúcleos

Imunofluorescência de tubulina e coloração de cromatina

Após fecundação *in vitro* e imunofluorescência de tubulina e coloração de cromatina, os possíveis zigotos foram classificados segundo o estágio nuclear em Metáfase II (MII; Figura 4), transição Anáfase/Telófase (A/T; Figura 5) e pronuclear (PN; Figura 6). Os zigotos em estágio PN foram classificados em: 2 PN de tamanhos diferentes (masculino maior que o feminino), 2 PN de tamanhos iguais e 1 PN (Figura 6). A imunofluorescência dos microtúbulos permitiu a diferenciação do corpúsculo polar (presença de microtúbulos) da cabeça do espermatozóide fortemente condensada (ausência de microtúbulos) (Figuras 7 e 8).

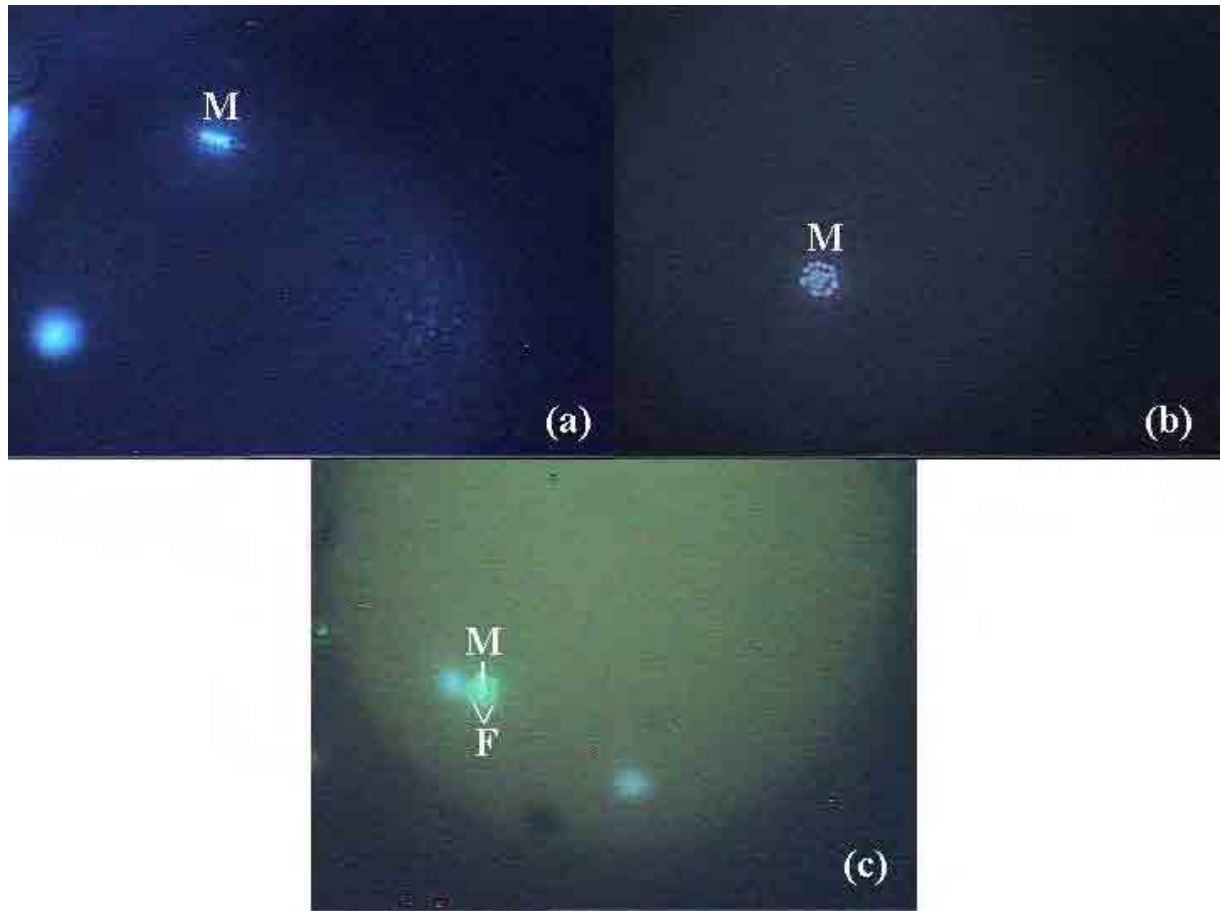


Figura 4. Oócitos no estágio de Metáfase II (M) coletados em diferentes momentos após o início da fecundação *in vitro* (FIV). (a) 14h após FIV; (b) 16h após FIV; (c) 18h após FIV. Azul: DNA corado com 10 μ g/mL de Hoechst 33342 por 10min; Verde: microtúbulos ou fusos (F) marcados por imunofluorescência com anticorpo anti- α -tubulina (1:50) conjugado a FITC.

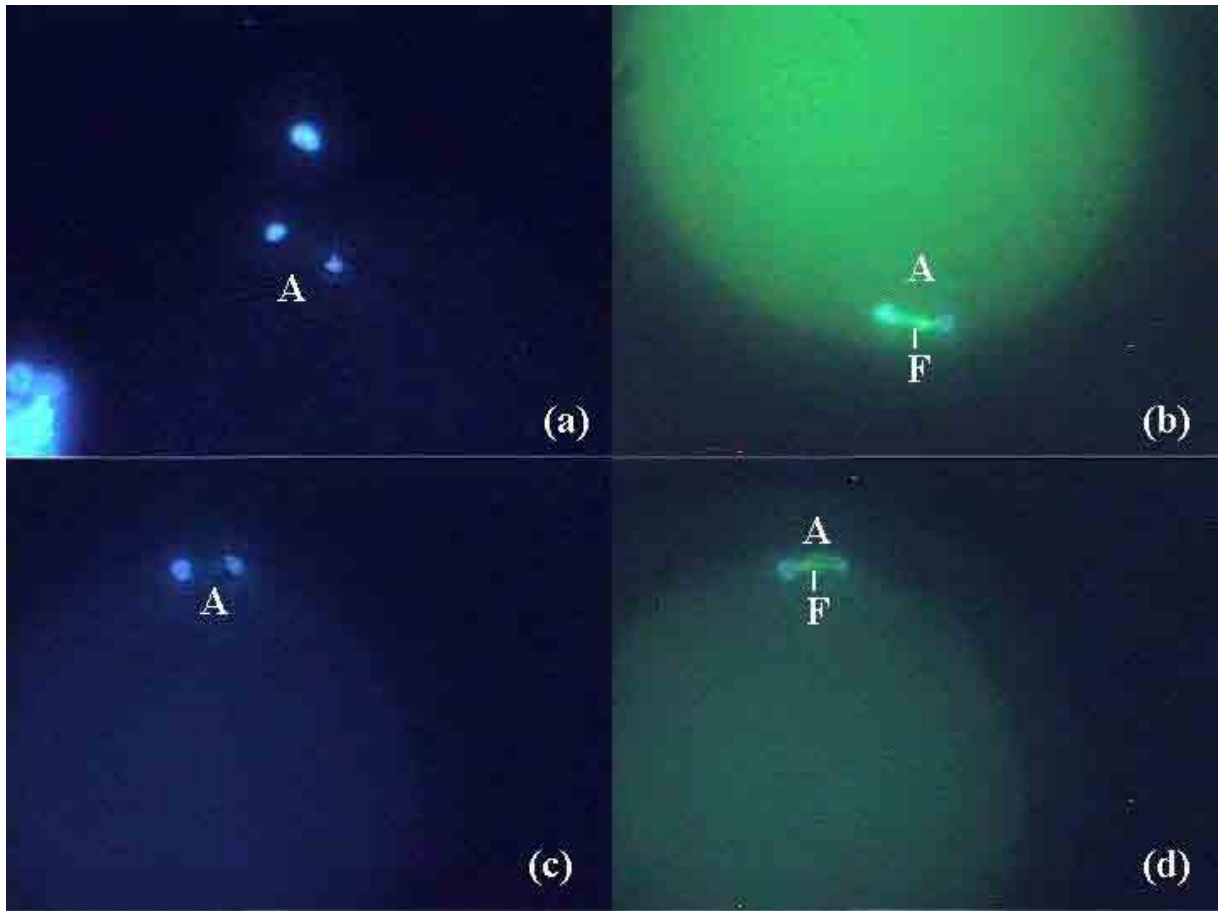


Figura 5. Zigotos no estágio de transição Anáfase/Telófase (A), coletados em diferentes momentos após o início da fecundação *in vitro* (FIV). (a) 10h após FIV; (b) 2h após FIV; (c-d, mesmo zigoto) 2h após FIV. Azul: DNA corado com 10 μ g/mL de Hoechst 33342 por 10min; Verde: microtúbulos ou fusos (F) marcados por imunofluorescência com anticorpo anti- α -tubulina (1:50) conjugado a FITC.

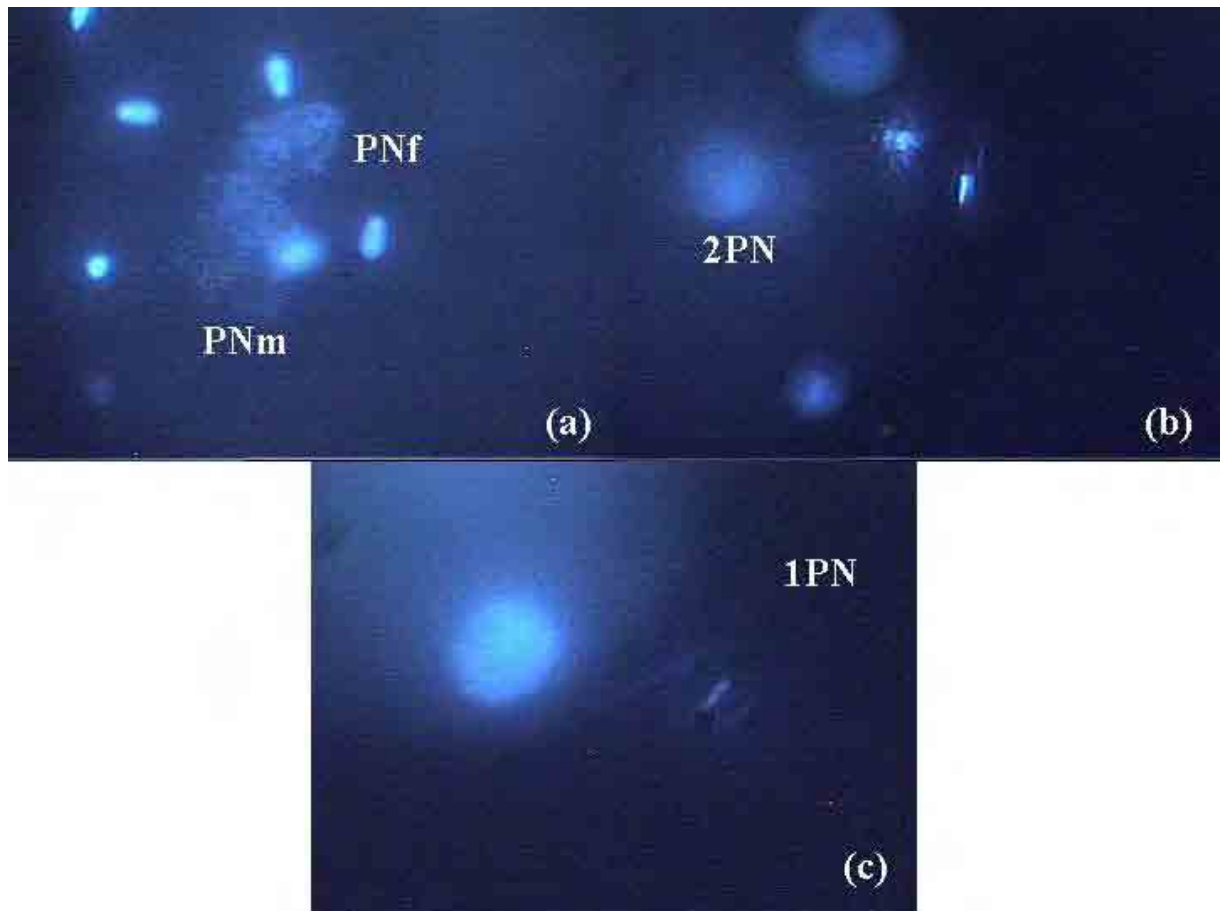


Figura 6. Estádio pronuclear em zigotos coletados em diferentes momentos após o início da fecundação *in vitro* (FIV). a) Zigoto com 2 pronúcleos (PN) de tamanhos diferentes, 22h após FIV; (b) zigoto com 2 PN de tamanhos iguais, 20h após FIV; (c) zigoto com 1 PN, 24h após FIV. DNA corado com 10 μ g/mL de Hoechst 33342 por 10min. PNf: pronúcleo feminino (menor); PNm: pronúcleo masculino (maior); 2PN: dois pronúcleos de tamanhos iguais; 1PN: um pronúcleo.

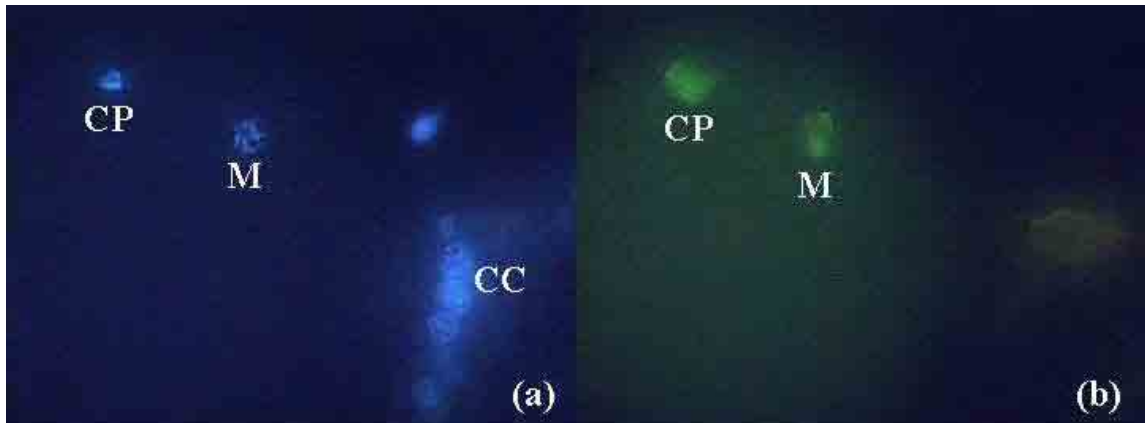


Figura 7. Oócito no estágio de Metáfase II (M) coletado 2h após o início da fecundação *in vitro*. (a) DNA corado com 10 μ g/mL de Hoechst 33342 por 10min; (b) microtúbulos marcados por imunofluorescência com anticorpo anti- α -tubulina (1:50) conjugado a FITC. Notar a presença de microtúbulos no corpúsculo polar (CP). CC: células do *cumulus*.

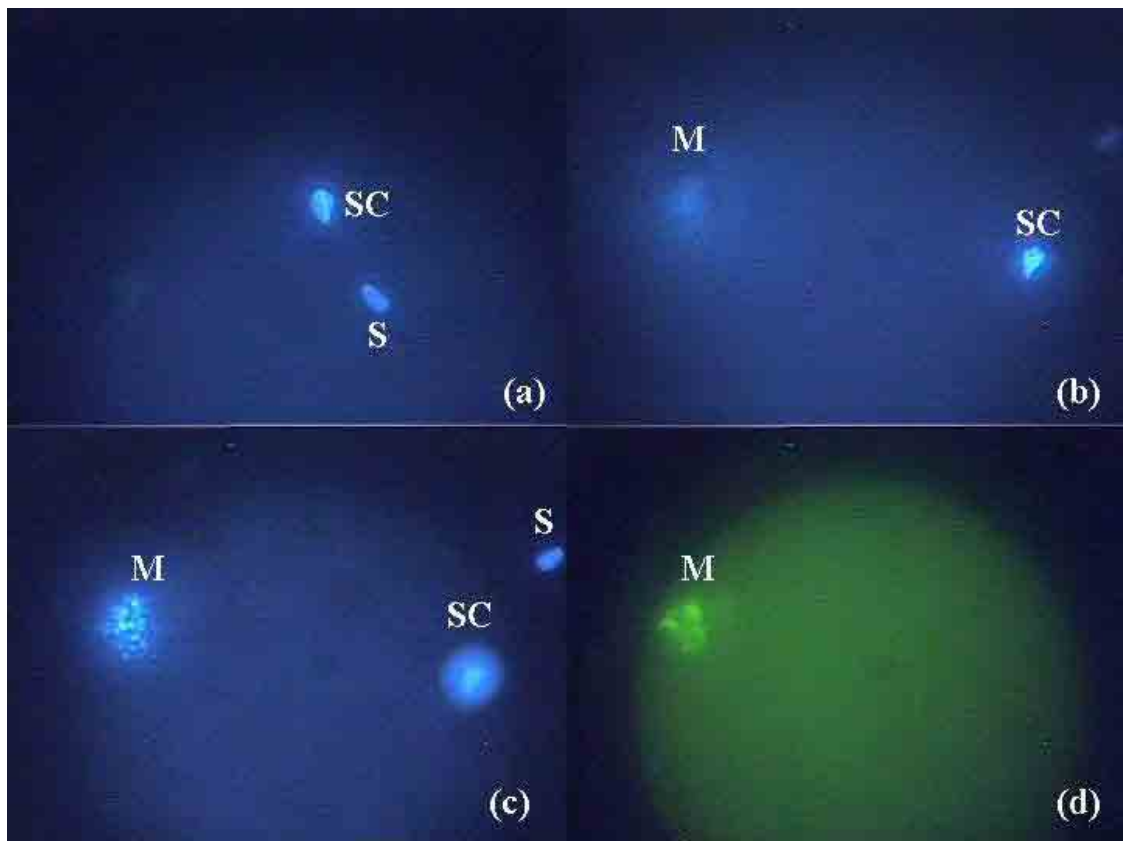


Figura 8. Presença da cabeça do espermatozóide com cromatina condensada (SC), no interior dos oócitos, em diferentes momentos após o início da fecundação *in vitro* (FIV). (a) 6h após FIV; (b-d, mesmo oócito) 4h após FIV. Notar a ausência

de microtúbulos no espermatozóide. Azul: DNA corado com 10µg/mL de Hoechst 33342 por 10min; Verde: microtúbulos marcados por imunofluorescência com anticorpo anti- α -tubulina (1:50) conjugado a FITC. M: Metáfase II; S: cabeça de espermatozóide fora do oócito.

Os resultados obtidos no experimento de imunofluorescência de tubulina e coloração de cromatina estão descritos na Tabela 3 e esquematizados na Figura 9. Após a fecundação *in vitro* (FIV), observamos a progressão normal do ciclo celular: de MII, passando por A/T, até a formação dos PN. O estágio de MII foi predominante de 2 a 8h de FIV (83,3-100%); MII (57,9%) e A/T (42,1%) predominaram às 10h; MII (28,6-44,4%), A/T (14,3-16,7%) e PN (38,9-57,1%) de 14 a 16h; e PN (61,9-83,3%) a partir de 18h.

Tabela 3. Número (porcentagem) de oócitos/zigotos coletados a intervalos de 2h, de 2 a 24h após o início da fecundação *in vitro*, quanto ao estágio de progressão nuclear: MII – Metáfase II; A/T – transição Anáfase/Telófase; PN – Pronúcleo.

	N	MI	A/T	PN
2h	22	19 (86,4) ^{a,b,A}	3 (13,6) ^{b,B}	0 (0,0) ^{d,B}
4h	18	18 (100,0) ^{a,A}	0 (0,0) ^{b,B}	0 (0,0) ^{d,B}
6h	20	19 (95,0) ^{a,A}	1 (5,0) ^{b,B}	0 (0,0) ^{d,B}
8h	24	20 (83,3) ^{a,b,c,A}	4 (16,7) ^{a,b,B}	0 (0,0) ^{d,B}
10h	19	11 (57,9) ^{c,d,e,A}	8 (42,1) ^{a,A}	0 (0,0) ^{d,B}
12h	20	12 (60,0) ^{b,c,d,A}	1 (5,0) ^{b,B}	7 (35,0) ^{c,A}
14h	21	6 (28,6) ^{e,f,g,A,B}	3 (14,3) ^{b,B}	12 (57,1) ^{a,b,c,A}
16h	18	8 (44,4) ^{d,e,f}	3 (16,7) ^{a,b}	7 (38,9) ^{b,c}
18h	19	5 (26,3) ^{f,g,A}	2 (10,5) ^{b,A}	12 (63,2) ^{a,b,c,B}
20h	17	5 (29,4) ^{d,e,f,g,A}	0 (0,0) ^{b,B}	12 (70,6) ^{a,b,C}
22h	21	8 (38,1) ^{d,e,f,A}	0 (0,0) ^{b,B}	13 (61,9) ^{a,b,c,A}
24h	24	3 (12,5) ^{g,A}	1 (4,2) ^{b,A}	20 (83,3) ^{a,B}

^{a,b,c,d,e,f,g}Valores com diferentes sobrescritos nas colunas são diferentes (P<0,05).

^{A,B,C}Valores com diferentes sobrescritos nas linhas são diferentes (P<0,05).

A primeira evidência de fecundação (estádio de transição A/T, 13,6%) foi observada 2h após a inseminação dos oócitos (Figura 5). No entanto, a presença da cabeça do espermatozóide, em seu interior, só foi observada após 4h (Figura 8). A ativação promovida pelo espermatozóide foi marcante após 10h de FIV, com redução significativa (P<0,05) do estágio de MII (de 83,3-100% para 57,9%) e aumento do

estádio de A/T (de 0-16,7% para 42,1%). A redução do estágio de MII completou-se em 14h. O estágio de transição A/T foi marcante após 10h de FIV e o desenvolvimento de pronúcleo teve início após 12h, mantendo-se constante de 14 a 24h (38,9-83,3%).

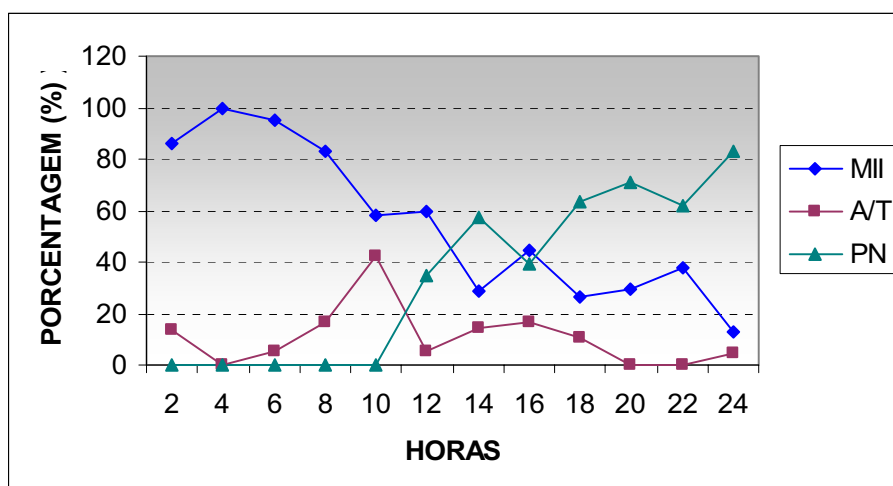


Figura 9. Porcentagem de oócitos/zigotos, coletados a intervalos de 2h, de 2 a 24h, após o início da fecundação *in vitro*, e avaliados quanto ao estágio de progressão nuclear. MII –Metáfase II; A/T – transição Anáfase/Telófase; PN – estágio pronuclear.

Na Tabela 4 e Figura 10, demonstramos o comportamento dos pronúcleos nos zigotos FIV de 12 a 24h, pois só foram observados pronúcleos após 12h da inseminação. Constatamos que a presença de 2 pronúcleos de tamanhos diferentes (masculino maior que o feminino) predominou ($P < 0,05$) às 14 e 18 h (66,7 e 75,0%), e que a quantidade de 1 PN (55,0%) foi maior ($P < 0,05$) que a de 2 PN diferentes (20,0%) após 24h de FIV. Mesmo nos momentos em que houve predominância de 2 PN de tamanhos diferentes (até 18h), foram encontrados zigotos com 1 PN (16,7-28,6%).

Tabela 4. Número (porcentagem) de zigotos bovinos em estágio pronuclear de 12 a 24h após o início da fecundação. 2PN diferentes – zigotos com 2 pronúcleos de tamanhos diferentes (1 pronúcleo masculino maior e 1 pronúcleo feminino menor); 2PN iguais – zigotos com 2 pronúcleos de tamanhos iguais; 1 PN – zigotos com 1 pronúcleo.

	N	2PN diferentes	2 PN iguais	1 PN
12h	7	3 (42,9) ^{a,b}	2 (28,6)	2 (28,6)
14h	12	8 (66,7) ^{a,A}	1 (8,3) ^B	3 (25,0) ^B
16h	7	4 (57,1) ^{a,b}	1 (14,3)	2 (28,6)
18h	12	9 (75,0) ^{a,A}	1 (8,3) ^B	2 (16,7) ^B
20h	12	2 (16,7) ^b	6 (50,0)	4 (33,3)
22h	13	5 (38,5) ^{a,b}	6 (46,1)	2 (15,4)
24h	20	4 (20,0) ^{b,A}	5 (25,0) ^{A,B}	11 (55,0) ^B

^{a,b}Valores com diferentes sobrescritos nas colunas são diferentes ($P < 0,05$). ^{A,B}Valores com diferentes sobrescritos nas linhas são diferentes ($P < 0,05$).

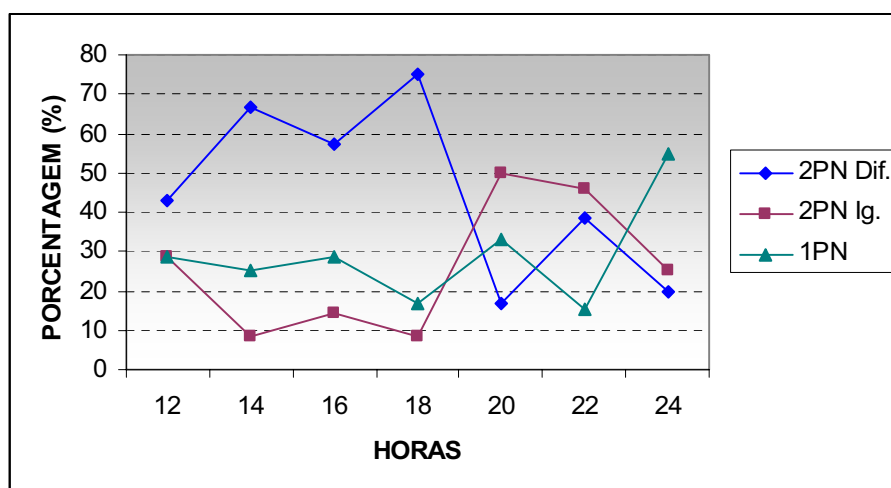


Figura 10. Porcentagem de zigotos coletados a intervalos de 2h, de 12 a 24h após o início da fecundação *in vitro*, e avaliados quanto ao comportamento dos pronúcleos. 2PN Dif. – zigotos com 2 pronúcleos de tamanhos diferentes (1 pronúcleo masculino maior e 1 pronúcleo feminino menor); 2PN Ig. – zigotos com 2 pronúcleos de tamanhos iguais; 1 PN – zigotos com um pronúcleo.

Discussão

Experimento I – Maturação nuclear e distribuição de grânulos corticais

Os padrões de distribuição dos GC em “clusters”, em transição e na periferia foram observados após maturação *in vitro* dos oócitos bovinos. Verificamos que a seleção dos oócitos, em graus I, II e III, atrésico e desnudo, não afetou o processo de maturação, tanto nuclear quanto citoplasmática avaliada pelo comportamento dos grânulos corticais. Dessa maneira, a taxa de maturação *in vitro* não foi melhorada pela utilização de oócitos de melhor qualidade morfológica. Isso está de acordo com os resultados obtidos por KIM et al. (1997), nos quais a maturação nuclear não foi diferente entre oócitos de *cumulus* intacto; sem *cumulus* e com *corona radiata*, e desnudos. No entanto, HOSOE e SHIOYA (1996) observaram menor maturação nuclear e citoplasmática (grânulos corticais em “clusters”), nos desnudos, e maior maturação citoplasmática (grânulos corticais periféricos), nos atrésicos, quando comparados aos viáveis.

Os oócitos atrésicos foram aspirados, provavelmente, a partir de folículos maiores, em mais adiantado processo de maturação ou em atresia e, por isso, apresentaram maturação nuclear e citoplasmática semelhantes aos demais grupos. O início precoce dos eventos de maturação, nos atrésicos, pode ser evidenciado pela observação de que, após a aspiração, 69,8% estavam em GVBD, enquanto quase 100% de viáveis e desnudos ainda se encontravam em GV (HOSOE e SHIOYA, 1996). Apesar da adequada maturação dos oócitos atrésicos, uma vez que a fecundação e o desenvolvimento diminuem com o tempo de maturação, ou seja, com o envelhecimento antes da fecundação (SAACKE et al., 2000), o desenvolvimento posterior desses pode ser prejudicado, e eles não devem ser utilizados nos procedimentos de produção *in vitro* de embriões.

Por outro lado, os oócitos desnudos estão em estágio de desenvolvimento similar aos viáveis e, geralmente, são gerados por falhas na técnica de puncionamento dos folículos, por excesso de pressão ou por diâmetro inadequado da agulha utilizada (BOLS, 1997). Por esse motivo, os desnudos não apresentaram comprometimento do

potencial de maturação. No entanto, visto que as células do *cumulus* beneficiam o desenvolvimento embrionário inicial (CHIAN e SIRARD, 1995; KIM et al., 1997) pela transmissão de informações pelas “gap junctions” (RICHARD e SIRARD, 1996), a ausência de células do *cumulus*, nos oócitos desnudos, pode afetar o acúmulo de fatores necessários para o desenvolvimento posterior dos embriões.

A utilização de diferentes suplementos no meio de maturação *in vitro*, apesar de, geralmente, não afetar a taxa de maturação nuclear, altera a maturação citoplasmática avaliada pela distribuição dos grânulos corticais e também sofre influência da classificação morfológica dos oócitos (DIAS, 2003; AVELINO, 2004). Neste caso, a utilização na MIV de SFB como fonte de macromolécula, que possui constituição pouco definida de fatores de crescimento, aminoácidos e proteínas benéficos ao desenvolvimento, favoreceu a maturação tanto nuclear quanto a distribuição dos grânulos corticais, independentemente da qualidade dos oócitos utilizados. Assim, a coloração de grânulos corticais pode ser utilizada, como rotina, para a avaliação da eficiência ou da falta de eficiência de sistemas de maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Observamos que 0-100% dos oócitos graus I, II e III com núcleo maduro (MII) apresentaram citoplasma imaturo (GC em “clusters”). Além disso, 10,7-22,2% dos oócitos com citoplasma maduro (GC periféricos), nas cinco classes morfológicas, evidenciaram núcleo imaturo. Dessa maneira, a maturação nuclear e a citoplasmática foram eventos independentes, ou seja, nem sempre a maturação nuclear foi acompanhada pela citoplasmática e vice-versa. Apesar de relatos de que a maturação nuclear é mais facilmente atingida que a citoplasmática, em nossos experimentos, em todas as classes de oócitos, a quantidade que atingiu maturação nuclear foi semelhante à citoplasmática, em relação aos grânulos corticais.

A maturação nuclear, nos diferentes grupos, variou de 78,4 a 87,8%, e foi semelhante à obtida por outros autores, de cerca de 80% em meio indefinido (KIM et al., 1997) e de 69-74% em meio definido sem soro e hormônios (LIM et al., 1999). Por outro lado, os resultados de maturação nuclear e citoplasmática (67,2-79,3% de grânulos corticais periféricos) foram superiores aos descritos por HOSOE e SHIOYA (1996), respectivamente, de 44,1-71,1% e 9,2-63,6%. Dessa maneira, podemos inferir

que, nessas condições, a maturação *in vitro* não deve ser um fator que comprometa o desenvolvimento posterior dos embriões.

Experimento II – Dinâmica da fecundação *in vitro* e formação de pronúcleos

Os resultados obtidos nos experimentos de imunofluorescência de tubulina e coloração de cromatina demonstraram que os oócitos fecundados *in vitro* apresentaram progressão normal do ciclo celular: de Metafase II (MII), passando por Anáfase/Telófase II (A/T), até a formação dos pronúcleos (PN). O estágio de MII foi predominante de 2 a 8h de FIV; MII e A/T predominaram às 10h; MII, A/T e PN de 14 a 16h; e PN a partir de 18h.

Observamos, pela primeira vez, o estágio de transição A/T, 2h após a inseminação dos oócitos. No entanto, como a cabeça do espermatozóide só foi observada em seu interior após 4h, provavelmente, os observados em A/T às 2h estavam completando a primeira divisão da meiose e não a segunda, visto que também não foi observado corpúsculo polar. Dessa maneira, consideramos como primeira evidência de fecundação, a penetração do espermatozóide, que ocorreu 4h após a inseminação. Outros trabalhos relataram penetração 3h após a inseminação, com a pré-incubação por 7h para capacitação de espermatozóides descongelados e separados em gradiente de Percoll (SAEKI et al., 1991) e com a utilização de cafeína no meio de FIV após descongelação e separação de espermatozóides por centrifugação (LIM et al., 1999). Assim, o momento de penetração do espermatozóide no oócito pode ser influenciado pela técnica de preparo do sêmen e pelos suplementos utilizados no meio de fecundação.

Na FIV, a redução do estágio de MII foi marcante após 10h e completou-se em 14h. A partir dessas observações, acreditamos que, nas condições aqui descritas, a co-incubação de espermatozóides e oócitos por 10h seria suficiente para tornar a FIV efetiva e, se necessário, diminuir a ocorrência de polispermia. Já foram relatados bons resultados de desenvolvimento embrionário (até 48% de blastocisto), após co-incubação por 5 horas (MAEDA et al., 1996), demonstrando que, para cada laboratório,

o período de FIV pode ser ajustado de acordo com touro, método de preparo do sêmen, meios e suplementos utilizados.

Em relação ao comportamento dos pronúcleos, constatamos que eles aparecem, pela primeira vez, após 12h da inseminação dos oócitos. Por outro lado, nos trabalhos citados anteriormente, em que a fecundação ocorreu mais rapidamente (em 3h), a formação dos pronúcleos também foi mais precoce, cerca de 7h (SAEKI et al., 1991) e 8h (LIM et al., 1999) após a inseminação, provavelmente devido à influência do protocolo de FIV.

A presença de 2 pronúcleos de tamanhos diferentes (masculino maior que feminino) predominou às 14 e 18h e a quantidade de 1 PN foi maior que a de 2 PN diferentes, após 24h de FIV. Assim, o melhor momento para a diferenciação entre os pronúcleos masculino e feminino deu-se entre 14 e 18h após o início da FIV, enquanto que a singamia (união dos pronúcleos masculino e feminino) ocorreu em maior frequência após 24h de FIV. Uma vez que foram observados zigotos com 1 PN de 12 a 18h após a fecundação, em momentos em que houve predomínio de 2 PN de tamanhos diferentes, novos estudos devem buscar avaliar se, nesses casos, os zigotos apresentaram desenvolvimento mais rápido e, conseqüentemente, possuem maior potencial de atingirem o estágio de blastocisto (MEIRELLES et al., 2004), ou sofreram ativação partenogenética e são incompatíveis com o desenvolvimento a termo.

Esses resultados são importantes para avaliação da eficiência da FIV e para aplicação de técnicas que necessitam da visualização e da identificação dos pronúcleos. Dentre elas, a transferência pronuclear para estudo de interação núcleo-citoplasmática (McGRATH e SOLTER, 1986), herança mitocondrial (MEIRELLES e SMITH, 1997) e produção de embriões andro e ginogenéticos (HAGEMANN et al., 1998), e a injeção pronuclear para produção de animais transgênicos (CHAN, 1999).

Conclusões

As taxas de maturação nuclear e citoplasmática, avaliada pela coloração dos grânulos corticais, não foram afetadas pela seleção morfológica dos oócitos antes da maturação *in vitro* em TCM 199 com soro fetal bovino, hormônios, antibiótico e piruvato.

Os eventos de maturação nuclear e citoplasmática, em oócitos bovinos, foram independentes.

A penetração do espermatozóide ocorreu, aproximadamente, 4h após a inseminação de oócitos bovinos maturados *in vitro* com sêmen preparado por centrifugação em gradiente de Percoll e meio de FIV suplementado com heparina, penicilamina, hipotaurina e epinefrina.

Em zigotos bovinos, foi possível diferenciar o pronúcleo feminino do masculino pelo tamanho entre 14 e 18h após a inseminação dos oócitos.

Em zigotos bovinos, a singamia dos pronúcleos ocorreu a partir das 24h.

CAPÍTULO 3 – INTERAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMÁTICA ENTRE EMBRIÕES BOVINOS ATIVADOS COM ESTRÔNCIO E 6-DMAP

Título

Interação Núcleo-Citoplasmática entre Embriões Bovinos Ativados com Estrônncio e 6-DMAP

Resumo

RESUMO – O genoma após a fecundação ou ativação é influenciado pelo citoplasma do oócito e essa interação núcleo-citoplasmática pode ser avaliada por transferência pronuclear (TP). Oócitos bovinos maturados *in vitro* foram fecundados (FIV) ou ativados com ionomicina seguida por estrônncio (IS) ou 6-DMAP (ID) e submetidos à TP. Durante a padronização da técnica, observamos que a centrifugação não afetou o potencial de desenvolvimento, e que alguns zigotos sem pronúcleos visíveis desenvolveram-se até blastocisto. Zigotos FIV e ID que clivaram em até 28h apresentaram taxa de desenvolvimento (59,3-61,9%) superior aos clivados em 28-48h (33,4-40,9%). A TP no mesmo tratamento, não influenciou as taxas de clivagem e blastocisto em embriões ativados (TP-IS: 73,6 e 7,3%; TP-ID: 73,3 e 31,7%), quando comparados aos controles (IS: 77,9 e 7,8%; ID: 83,1 e 41,5%), mas sim, em embriões fecundados (TP-FIV: 56,2 e 2,2% *versus* FIV: 69,6 e 21,7%). A troca de pronúcleos entre zigotos ativados por IS e ID permitiu a produção de embriões com citoplasma IS e núcleo ID (CSND) e citoplasma ID e núcleo IS (CDNS). As taxas de clivagem e desenvolvimento até os estádios de oito células e blastocisto, respectivamente, foram semelhantes entre CSND (76,5; 36,4 e 6,8%) e CDNS (69,5; 25,0 e 4,9%). As taxas de desenvolvimento em CSND foram semelhantes a TP-IS e inferiores a TP-ID, evidenciando efeito de citoplasma IS sobre núcleo ID. CSND e CDNS apresentaram

maior taxa de bloqueio embrionário entre os estádios de duas e oito células que os grupos-controle da técnica (TP-IS e TP-ID). Assim, a transferência pronuclear pode ser utilizada para avaliação de interação núcleo-citoplasmática, de tratamentos de ativação e de eventos relacionados ao desenvolvimento e ao bloqueio do desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: Bloqueio do desenvolvimento, Desenvolvimento embrionário, Reprogramação, Transferência pronuclear, Zigotos

Introdução

A fecundação une dois gametas com diferentes características celulares e moleculares, que se modificam mutuamente e desencadeiam alteração em “imprints” parentais, remodelação dos cromossomos, desmetilação global do genoma (ativa nos espermatozóides e passiva nos oócitos) e substituição de protaminas espermáticas por histonas (MOORE e REIK, 1996; MANN e BARTOLOMEI, 2002). Esses eventos são essenciais para o desenvolvimento posterior do embrião e, em sua maioria, são condicionados por fatores presentes no citoplasma do oócito.

Uma vez que a interação entre os genomas materno e paterno e o citoplasma ocorre imediatamente após a fecundação, as modificações decorrentes podem ser estudadas pela transferência pronuclear (TP) entre zigotos. Por meio dessa técnica, é possível avaliar a influência da interação núcleo-citoplasmática sobre o desenvolvimento embrionário (McGRATH e SOLTER, 1986) e os mecanismos de herança mitocondrial (MEIRELLES e SMITH, 1997). Além disso, a TP é utilizada em procedimentos de reclone ou transferência nuclear seriada (PEURA e TROUNSON, 1998) e na produção de embriões gino e androgenéticos (HAGEMANN et al., 1998).

A técnica de transferência pronuclear é bastante aplicada em camundongos (BARTON et al., 1984; MEIRELLES e SMITH, 1997; LIU et al., 2001; HAN et al., 2005),

nos quais os pronúcleos são claramente visíveis. No entanto, a opacidade do citoplasma, devido ao elevado conteúdo lipídico, em oócitos de ruminantes e suínos (WESTHUSIN e De AZAMBUJA, 1996; NAGASHIMA et al., 1997; HAGEMANN et al., 1998), requer a centrifugação dos zigotos para a visualização dos pronúcleos (WALL, 2001). A centrifugação promove fracionamento das organelas citoplasmáticas em: gotas de lipídeos e vacúolos, vesículas e retículo endoplasmático liso, matriz citoplasmática sem organelas e mitocôndrias (CRAN, 1987) e permite a produção de citoplastos enriquecidos em diferentes componentes celulares para posterior utilização na clonagem (MADDOX-HYTTEL et al., 2004).

A capacidade do citoplasma do oócito em promover a reprogramação dos genomas é a base para o sucesso da clonagem por transferência nuclear de célula somática (SCNT). Na SCNT, para que o oócito enucleado em Metáfase II promova a reprogramação do núcleo transferido, os níveis do fator promotor de maturação (MPF) devem ser adequados para desencadear ruptura da membrana nuclear e condensação prematura da cromatina (BARTON et al., 1984; COLLAS, 1998), de maneira que o núcleo seja exposto aos fatores presentes no citoplasma. Posteriormente, para que o núcleo transferido retome o desenvolvimento, os níveis de MPF devem ser reduzidos por meio da ação de algum tratamento de ativação.

Vários tratamentos artificiais de ativação já foram descritos e atuam por mecanismos diversos. Alguns promovem o aumento de cálcio intracelular, como estrôncio (CUTHBERTSON et al., 1981) e ionomicina, enquanto outros inibem a fosforilação protéica, como 6-dimetilaminopurina (6-DMAP; SUSKO-PARRISH et al., 1994). Entretanto, apesar de buscarem mimetizar os efeitos promovidos pelo espermatozóide, nenhum deles é completamente capaz de promover todos os eventos da fecundação (NAKADA e MIZUNO, 1998).

O citoplasma do oócito desempenha importante papel não só imediatamente após a fecundação e para a reprogramação, como também é responsável pelo suprimento de RNAm e proteínas necessários para manutenção do embrião até a ativação principal do genoma, que, em bovinos, acontece no quarto ciclo celular, no

estádio de oito células (KNIJN et al., 2002; FAVETTA et al., 2004; MEIRELLES et al., 2004).

Neste trabalho, buscamos avaliar os efeitos da interação núcleo-citoplasmática sobre o desenvolvimento e o bloqueio do desenvolvimento pré-implantação de embriões reconstituídos. Para tanto, avaliamos as condições de centrifugação, os efeitos da mesma sobre o desenvolvimento, o potencial de visualização e diferenciação dos pronúcleos e a capacidade de desenvolvimento após clivagem precoce ou tardia e após transferência pronuclear entre zigotos bovinos produzidos por ativação com ionomicina seguida de estrôncio ou 6-DMAP. Dessa maneira, objetivamos padronizar e utilizar a transferência pronuclear para estudar a capacidade de citoplasma ativado por um tratamento em dar suporte a núcleo produzido por tratamento diferente e melhor compreender os eventos desencadeados sobre o desenvolvimento embrionário.

Material e Métodos

Coleta de oócitos e maturação *in vitro*

Ovários bovinos coletados em abatedouro foram transportados ao laboratório, em solução salina a 28-32°C, e seus folículos antrais com diâmetro de 3 a 7mm foram aspirados por agulha de 18-G adaptada à seringa de 20mL. O fluido folicular aspirado foi transferido para tubo cônico de 50mL e decantado por 15min para a separação dos oócitos. Posteriormente, o sedimento foi transferido para placa de Petri e visualizado em microscópio estereoscópico. Os oócitos de *cumulus* compacto ou com, pelo menos, 2 camadas de células foram selecionados e maturados *in vitro* (MIV), em grupos de 20 a 25, em gotas de 100µL de meio de MIV, cobertas por óleo mineral (Dow Corning 200 Fluid 50CST). O meio de MIV foi o TCM 199 com sais de Earle (Gibco 31.100) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; inativado a 55°C por 30min), 1,0µg/mL de FSH (Pluset[®], Calier), 50µg/mL de hCG (Vetecor[®], Calier), 1,0µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e

83,4µg/mL de amicacina (Biochimico), durante 24h, à temperatura de 38,5-39°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Fecundação *in vitro*

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada 24h após o início da maturação. Os oócitos, em grupos de 20 a 25, foram dispostos em gotas de 100µL de meio TALP-FIV [TALP com 30µg/mL de heparina (Sigma H-3149), 18µM de penicilamina (Sigma P-4875), 10µM de hipotaurina (Sigma H-1384) e 1,8µM de epinefrina (Sigma E-4250)], suplementado com 0,2mM de piruvato, 83,4µg/mL de amicacina e 6mg/mL de albumina sérica bovina (BSA; Sigma A-6003), cobertas com óleo mineral. O sêmen, congelado em palhetas de 0,5mL, foi aquecido a 35°C por 30seg e preparado por duas centrifugações a 95xg, 5min cada, em 2mL de meio TALP-sêmen [TALP com 10mM de hepes ácido (J.T. Baker 4018-01)]. Foram recuperados 30µL do sedimento, que foram avaliados quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozóides vivos/mL com meio TALP-FIV. Posteriormente, 4µL do sêmen diluído foram adicionados às gotas contendo os oócitos para obtenção da concentração final de 1×10^5 espermatozóides vivos/gota (1×10^6 /mL). O período de co-incubação, a 38,5-39°C e 5% de CO₂ em ar, foi de 22-24h para padronização da centrifugação, produção de embriões-controle e transferência pronuclear. Após esse intervalo, as células do *cumulus* foram removidas por pipetagem.

Ativação partenogenética

Para a produção de embriões partenogenéticos, oócitos maturados por 24h foram desnudados em meio PBS livre de cálcio, com 0,1% de álcool polivinílico (Sigma P-8136) e 0,5% de hialuronidase (pré-aquecida por 2h a 39°C; Hyalozima[®], Aspen), por pipetagem durante 3-5min. Os oócitos desnudos, de citoplasma homogêneo e com o primeiro corpúsculo polar, visualizado em microscópio estereoscópico, foram selecionados para os tratamentos de ativação.

Os tratamentos utilizados para a produção de embriões partenogenéticos diplóides foram os seguintes:

Ionomicina + Estrôncio (IS): incubação em 5 μ M de ionomicina (Calbiochem 407950) em meio HSOF [SOF com 5mM de bicarbonato (Mallinckrodt 7412), 10mM de hepes ácido, 10mM de hepes sódico (Sigma H-3784) e 10% de SFB] por 5min em temperatura ambiente, seguida por incubação em 20mM de estrôncio (SrCl₂; Mallinckrodt 8228) com 10 μ g/mL de citocalasina D (Cito D; Sigma C-8273) em meio TALP sem Ca²⁺ e Mg²⁺, por 6h, a 38,5-39°C e 5% de CO₂.

Ionomicina + 6-DMAP (ID): incubação em 5 μ M de ionomicina em meio HSOF por 5min em temperatura ambiente, seguida por incubação em 2mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP; Sigma D-9163) em meio TALP, por 4h, a 38,5-39°C e 5% de CO₂.

Após a ativação, os oócitos foram transferidos para meio TALP até os procedimentos de padronização da centrifugação, produção de embriões-controle e transferência pronuclear.

Condições de centrifugação

Para separação do conteúdo lipídico e visualização dos pronúcleos, os embriões produzidos por FIV, IS e ID foram depositados em microtubos de 1,5mL com 250 μ L de meio HSOF e 10 μ g/mL de Cito D, e centrifugados a 15.000 ou 18.000xg, na Centrífuga Hettich Zentrifugen Universal 32R (Tuttlingen, Alemanha), por 5 ou 15min a 25°C.

Para avaliação das condições e dos efeitos da centrifugação, embriões centrifugados entre 14 e 18h após a fecundação ou ativação (hpf) e não centrifugados foram destinados ao cultivo. Para a diferenciação entre os pronúcleos masculino e feminino, zigotos FIV foram centrifugados entre 14 e 18hpf. Além disso, para determinação do potencial de visualização dos pronúcleos, foram cultivados embriões com ou sem pronúcleos visíveis após centrifugação entre 24 e 30hpf.

Embriões-controle

Para a produção de embriões-controle, zigotos produzidos por FIV, IS e ID, 24-30h após o início da ativação ou da inseminação dos oócitos, foram centrifugados a

15.000xg por 15min, nas condições descritas anteriormente, e somente aqueles com pronúcleos visíveis foram destinados ao cultivo.

Preparo das pipetas de micromanipulação

As pipetas “holding” e “injection” foram preparadas a partir de capilar de borossilicato de vidro (D.E.: 1,0mm, D.I.: 0,75mm, 10cm de comprimento, Sutter Instrument Company). Para a produção da “holding” (Figura 1), o capilar foi esticado manualmente, em bico de Bunsen (Figura 1a), e cortado na microforja (aumento de 80X), ao diâmetro externo de 100-150 μ m (Figuras 1b,c,d). A extremidade da “holding” foi fechada até atingir o diâmetro interno de 25 μ m (Figuras 1e,f), com posterior execução de duas dobras opostas na pipeta (Figuras 1g,h,i) a fim de permitir seu posicionamento na câmara de micromanipulação.

Para a “injection” (Figura 2), o capilar foi esticado no P-2000 Micropipette Puller (Sutter Instrument Company; Figura 2a), no programa: heat = 500, fil = 4, vel = 50, del = 225, pul = 150 (Figuras 2b,c). Na microforja (aumento de 80X), a pipeta foi cortada ao diâmetro externo de 25 μ m (Figuras 2d,e), condicionada no esmerilhador EG-40 Micropipette Grinder (Narishige Co. Ltd.) em ângulo de 60° e, à velocidade 60 e pressão positiva com auxílio de seringa (Figura 2f), foi feito o bixel (Figuras 2g,h). A remoção de resíduos de vidro do interior da pipeta foi realizada mediante imersão em ácido fluorídrico (Sigma F-9755), seguida por banho em água (ambos repetidos por cinco vezes). Posteriormente, foi feita uma ponta na extremidade do bixel (Figura 2i) a fim de facilitar a perfuração da zona pelúcida dos zigotos.

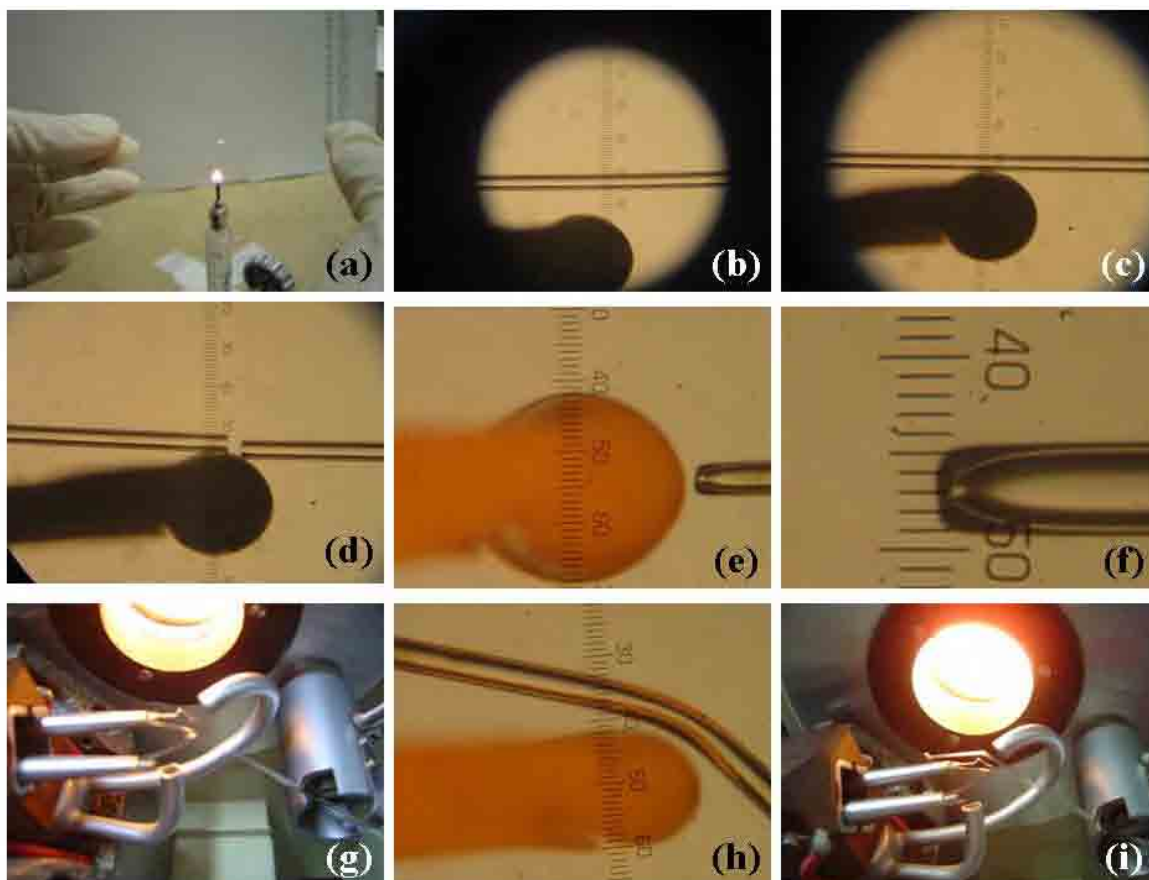


Figura 1. Preparação da pipeta “holding”. (a) Estiramento do capilar em bico de Bunsen; (b) mensuração do diâmetro externo do capilar em $100\text{-}150\mu\text{m}$ (4-6 espaços na régua); (c) aproximação do capilar à bola de vidro presente no filamento; (d) quebra espontânea do capilar após resfriamento do filamento; (e) fechamento da extremidade da pipeta por aproximação à bola de vidro do filamento aquecido; (f) extremidade da pipeta com diâmetro interno de $25\mu\text{m}$; (g) realização da primeira dobra na pipeta por (h) aproximação ao filamento aquecido; (i) realização da segunda dobra na pipeta.

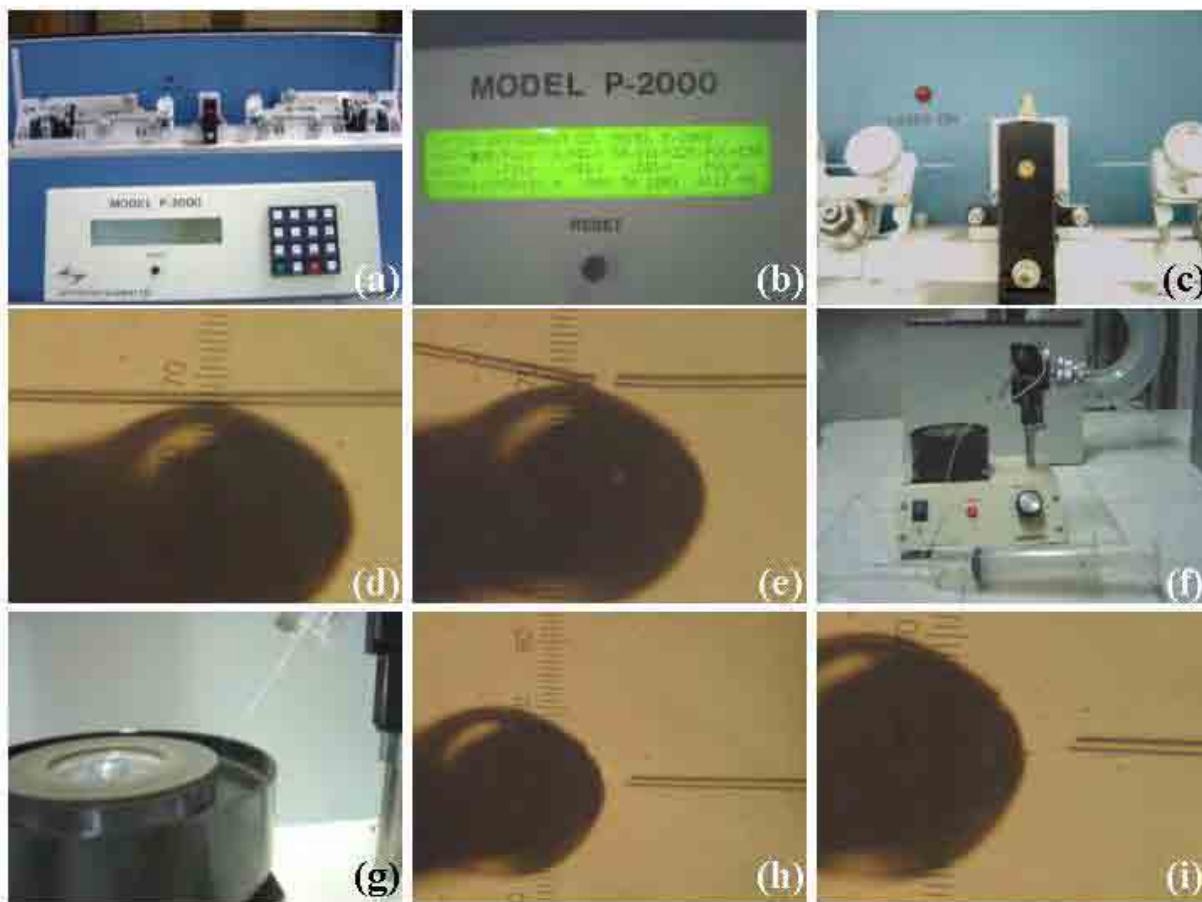


Figura 2. Preparação da pipeta “injection”. (a) Esticador automático de pipeta P-2000 Micropipette Puller, Sutter Instrument Company; (b) programa no esticador automático; (c) capilares após estiramento; (d) mensuração do diâmetro externo do capilar em 25µm e aproximação do capilar à bola de vidro presente no filamento; (e) quebra espontânea do capilar após resfriamento do filamento; (f) acoplamento do capilar, sob pressão positiva com auxílio de seringa, ao esmerilhador EG-40 Micropipette Grinder (Narishige Co. Ltd.); (g) capilar no esmerilhador para a confecção do bixel; (h) aproximação da ponta do bixel à bola de vidro do filamento; (i) ponta feita na extremidade do bixel.

Transferência pronuclear

Para o estudo da interação núcleo-citoplasmática, foi realizada a técnica de transferência pronuclear (McGRATH e SOLTER, 1984b; WESTHUSIN e De AZAMBUJA, 1996) em embriões partenogênicos e fecundados *in vitro*, 24-30h após o início da ativação ou da inseminação dos oócitos. Para tanto, os zigotos foram centrifugados, nas mesmas condições descritas para os embriões-controle, e

transferidos para gota de micromanipulação de HSOF com $7,5\mu\text{g/mL}$ de citocalasina B (Cito B; Sigma C-6762), montada sobre tampa de placa de poliestireno de 60mm, em platina aquecedora a 38°C de microscópio óptico invertido (Olympus IX-70) equipado com Hoffman Modulator Contrast e micromanipuladores (Figura 3). Foram utilizadas duas pipetas de preensão ou “holding” (uma para cada tratamento) e uma pipeta de injeção ou “injection”. A técnica de transferência pronuclear consistiu na remoção dos pronúcleos (1 ou 2) de um embrião e posterior injeção no espaço perivitelínico do mesmo embrião (grupo-controle da técnica) ou de outro embrião previamente enucleado (entre tratamentos diferentes).

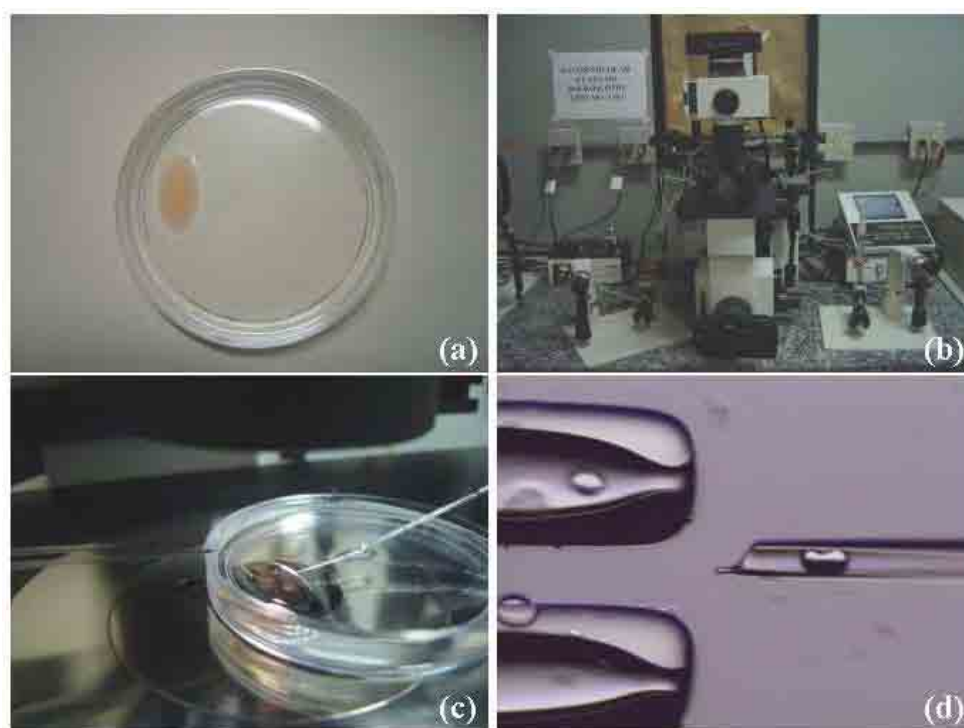


Figura 3. Preparo e montagem da câmara de micromanipulação. (a) Câmara de micromanipulação com gota de meio HSOF coberta por óleo mineral; (b,c) microscópio invertido com câmara de micromanipulação, duas pipetas “holdings” à esquerda e uma pipeta “injection” à direita; (d) visualização das extremidades das pipetas “holdings” e “injection” sob microscopia.

Após a transferência, os pronúcleos foram unidos ao citoplasma receptor por eletrofusão: 2 pulsos DC de $1,5\text{kV/cm}$ (30V) por $30\mu\text{seg}$, em solução de manitol [0,28mM de manitol (Sigma M-1902), 0,1mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 1.02382), 0,1mM

de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck 5886) e 3mg/mL de BSA], em câmara Eppendorf (distância entre pólos de $200\mu\text{m}$), no equipamento Electrocell Manipulator 2001 (BTX) (Figura 4).



Figura 4. Eletrofusão. (a) Câmara de eletrofusão; (b) ligação do pólo positivo (vermelho) à esquerda e do pólo negativo (preto) à direita da câmara de eletrofusão; (c) posicionamento do zigoto reconstituído na câmara de eletrofusão: pronúcleo transferido à esquerda (próximo ao pólo positivo) e citoplasma à direita (próximo ao pólo negativo); (d) Electrocell Manipulator 2001 BTX; (e) programação do equipamento de eletrofusão; (f) mensuração do pulso aplicado (aproximadamente, 30V) pelo BTX Enhancer.

A transferência pronuclear proporcionou a formação dos cinco tipos de embriões enumerados a seguir:

a) Embriões-controle da técnica: três tipos, produzidos pela retirada dos pronúcleos e reconstituição do mesmo embrião com os pronúcleos removidos. Foram denominados de TP-FIV (em embriões FIV), TP-IS (em IS) e TP-ID (em ID).

b) Embriões com citoplasma ativado por um tratamento e núcleo ativado por outro: dois tipos, produzidos pela remoção de pronúcleos de embrião IS e reconstituição com pronúcleos de ID, e vice-versa. Dessa maneira, foram obtidos embriões CSND (citoplasma IS e núcleo ID) e CDNS (citoplasma ID e núcleo IS).

Cultivo de embriões

Os embriões produzidos para avaliação das condições de centrifugação, os embriões-controle e os de transferência pronuclear foram submetidos a cultivo de desenvolvimento em gotas de 100 μ L de meio SOF, suplementado com 2,5% de SFB e 3mg/mL de BSA livre de ácidos graxos (Sigma A-8806), em co-cultivo com células da granulosa, à temperatura de 38,5-39°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar, até os procedimentos de avaliação. A cada 48h, foi realizado o “feeding”, ou seja, a substituição de 50 μ L do meio das gotas de desenvolvimento por meio SOF recém-preparado.

Avaliação do desenvolvimento embrionário pré-implantação

A clivagem foi avaliada, sob microscópio estereoscópico, 46-48h após o início da fecundação ou da ativação dos oócitos, e os embriões de duas e quatro células foram considerados clivados. A taxa de desenvolvimento até o estágio de oito células, nos embriões ativados submetidos à transferência pronuclear, foi observada após 4 dias (aproximadamente, 100hpf) e o desenvolvimento até blastocisto, após 7 dias.

Análise estatística

As taxas de formação de pronúcleo, reconstituição, fusão, lise após fusão, clivagem e desenvolvimento até os estádios de oito células e blastocisto foram avaliados pelo teste de χ^2 ou, quando apropriado, pelo teste Exato de Fisher, no SAS (Versão 8.2), ao nível de significância de 5%.

Resultados

Padronização das condições de centrifugação

Uma vez que os oócitos bovinos apresentam elevado conteúdo lipídico, a centrifugação dos zigotos, em meio contendo citocalasina, foi imprescindível para a visualização dos pronúcleos. Visando avaliar a força adequada, os zigotos foram,

inicialmente, centrifugados a 15.000 ou 18.000xg por 5min, mas não obtivemos separação satisfatória do conteúdo citoplasmático (Figura 5a). Posteriormente, utilizamos 15.000xg por 15min, obtivemos resultados mais eficientes (Figura 5b), e estabelecemos tais condições para os procedimentos seguintes.

Nos zigotos, pôde ser observado o padrão de separação dos componentes citoplasmáticos em quatro frações: 1) gotas de lipídeos; 2) vesículas delimitadas por retículo endoplasmático liso; 3) matriz citoplasmática sem organelas; e 4) mitocôndrias (CRAN, 1987; MADDOX-HYTTEL et al., 2004) (Figura 5b).

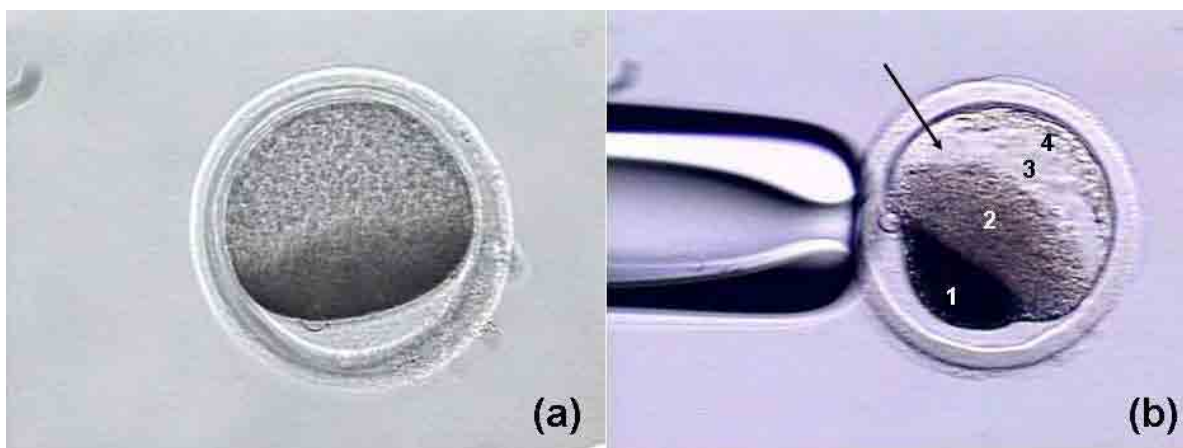


Figura 5. Zigotos submetidos à centrifugação a 15.000xg por (a) 5min e (b) 15min para separação do conteúdo lipídico e visualização do pronúcleo (seta). (b) Conteúdo citoplasmático separado em: 1) gotas de lipídeos e grandes vacúolos; 2) vesículas pequenas delimitadas por retículo endoplasmático liso; 3) matriz citoplasmática sem organelas; 4) mitocôndrias (classificado segundo CRAN et al., 1987; MADDOX-HYTTEL et al., 2004).

Efeito da centrifugação sobre o desenvolvimento embrionário

Devido à necessidade de centrifugação, avaliamos o efeito da mesma e da exposição à citocalasina sobre o desenvolvimento posterior dos embriões. Para tanto, oócitos fecundados (FIV) ou ativados (IS e ID), centrifugados ou não, foram destinados ao cultivo. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 1. Observamos que a centrifugação em meio contendo citocalasina não prejudicou ($P>0,05$) a clivagem e o desenvolvimento até blastocisto no grupo FIV (67,7-71,2 e 15,1-17,8%) e a proporção de blastocistos em IS (12,1-15,1%). No tratamento ID, as taxas de clivagem e de

desenvolvimento até blastocisto foram superiores ($P < 0,05$) no grupo centrifugado (62,2 e 28,2%) em comparação ao não centrifugado (50,4 e 16,8%; Tabela 1).

As taxas de desenvolvimento até blastocisto nos zigotos ID centrifugados (28,2%) foram superiores ($P < 0,05$) às obtidas em zigotos FIV (15,1-17,8%) e IS (12,1-15,1%) centrifugados ou não (Tabela 1).

Tabela 1. Proporção (porcentagem) de clivagem (46-48hpf) e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Dia 7), em embriões bovinos fecundados *in vitro* (FIV) ou ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID), submetidos (centrifugado) ou não (controle) à centrifugação a 15.000xg por 15min, 14-18hpf, em HSOE com 10 μ g/mL de citocalasina D.

Tratamento	Clivagem	Desenvolvimento
FIV Controle	977/1442 (67,7) ^a	291/1632 (17,8) ^b
FIV Centrifugado	183/257 (71,2) ^a	46/304 (15,1) ^{b,c}
IS Controle	584/1081 (54,0) ^{b,c}	86/570 (15,1) ^{b,c}
IS Centrifugado	-	24/199 (12,1) ^c
ID Controle	674/1336 (50,4) ^c	189/1126 (16,8) ^{b,c}
ID Centrifugado	69/111 (62,2) ^{a,b}	100/354 (28,2) ^a

^{a,b,c} Valores com sobrescritos diferentes nas colunas, diferem entre si ($P < 0,05$).

Potencial de visualização e diferenciação dos pronúcleos

Para a padronização da transferência pronuclear, buscamos avaliar se foi possível visualizar os pronúcleos em todos os zigotos centrifugados. Assim, os embriões FIV, IS e ID com ou sem pronúcleos visíveis foram separados e destinados ao cultivo. Observamos que alguns classificados como sem pronúcleos, clivaram e desenvolveram-se (Tabela 2), de maneira que, nos embriões FIV, não houve diferença ($P > 0,05$) entre a clivagem e o desenvolvimento, respectivamente, daqueles com (69,6 e 21,7%) e sem pronúcleos (64,1 e 5,9%), assim como a proporção de blastocistos entre zigotos IS com (4,2%) e sem pronúcleos (3,4%). No tratamento ID, as taxas de clivagem e blastocisto, respectivamente, nos embriões sem pronúcleos (34,5 e 16%), foram inferiores ($P < 0,05$) às obtidas nos embriões em que a visualização dos mesmos foi possível (83,0 e 41,5%).

Na Tabela 2, observamos que as taxas de desenvolvimento até blastocisto nos zigotos ID com pronúcleos (41,5%) foram superiores ($P<0,05$) aos zigotos FIV com pronúcleos (21,7%).

Tabela 2. Proporção (porcentagem) de clivagem (46-48hpf) e de desenvolvimento até blastocisto (Dia 7), em embriões bovinos fecundados *in vitro* (FIV) ou ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID), nos quais foi possível (com PN) ou não (sem PN) a visualização dos pronúcleos, após centrifugação a 15.000xg por 15min, 24-30hpf, em HSOF com 10 μ g/mL de citocalasina D.

Tratamento	Clivagem	Desenvolvimento
FIV com PN	48/69 (69,6) ^{a,b}	15/69 (21,7) ^b
FIV sem PN	34/53 (64,1) ^b	1/17 (5,9) ^{b,c,d}
IS com PN	19/24 (79,2) ^{a,b}	1/24 (4,2) ^{c,d}
IS sem PN	-	4/119 (3,4) ^d
ID com PN	54/65 (83,0) ^a	27/65 (41,5) ^a
ID sem PN	10/29 (34,5) ^c	17/106 (16,0) ^{b,c}

^{a,b,c,d} Valores com sobrescritos diferentes nas colunas, diferem entre si ($P<0,05$).

Nos embriões FIV, a diferenciação entre os pronúcleos masculino e feminino pelo tamanho (masculino maior que feminino), após centrifugação 14-18hpf, não foi possível na grande maioria dos embriões. Em alguns casos, diferenças de tamanho só foram percebidas após enucleação, por observação do conteúdo removido no interior da pipeta "injection" (Figura 6).

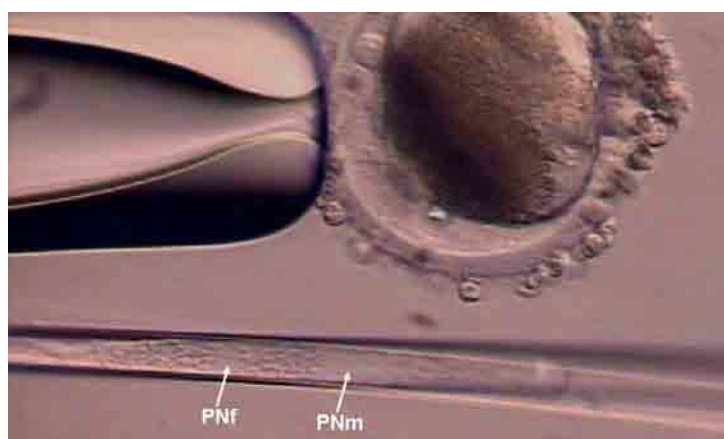


Figura 6. Visualização dos pronúcleos feminino (PNf; menor) e masculino (PNm; maior) no interior da pipeta "injection" após enucleação de zigoto fecundado *in vitro*.

Capacidade de desenvolvimento após clivagem precoce ou tardia

Durante os experimentos de transferência pronuclear, alguns embriões FIV e ID foram encontrados no estágio de duas células após 28h de cultivo, impossibilitando a realização da técnica nos mesmos. Visando avaliar o desenvolvimento posterior, submetemos ao cultivo os embriões clivados em até 28h e de 28-48h (Tabela 3). Os resultados demonstraram que os embriões FIV ($P=0,0563$) e ID ($P<0,05$) que clivaram em até 28h apresentaram maior potencial de desenvolvimento até o estágio de blastocisto: 61,9 e 59,3% em até 28h *versus* 40,9 e 33,4% de 28-48h, em FIV e ID, respectivamente.

Tabela 3. Proporção (porcentagem) de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Dia 7), em embriões bovinos fecundados *in vitro* (FIV) ou ativados com $5\mu\text{M}$ de ionomicina por 5min e 2mM de 6-DMAP por 4h (ID), clivados em até 28h (28h) ou entre 28 e 48h (48h) após a fecundação ou ativação.

Tratamento	Desenvolvimento
FIV 28h	13/21 (61,9) ^{a,b}
FIV 48h	196/479 (40,9) ^b
ID 28h	35/59 (59,3) ^a
ID 48h	189/566 (33,4) ^c

^{a,b,c} Valores com sobrescritos diferentes na coluna, diferem entre si ($P<0,05$).

Avaliação da técnica de transferência pronuclear: produção de embriões-controle

Padronizadas as condições da técnica, os experimentos de transferência pronuclear (TP) foram realizados (Figuras 7 e 8) e apresentaram média de 76,6% de reconstituição, 78,7% de fusão e 17,3% de lise após fusão. Ao avaliarmos esses parâmetros pelos tipos de citoplasma e núcleo gerados após TP, observamos que FIV, IS e ID foram semelhantes ($P>0,05$) em reconstituição (74,6-79,3%) e em fusão (76,9-79,7%). Entretanto, maiores ($P<0,05$) taxas de lise ocorreram em citoplasma FIV (18,9%) e IS (18,6%) e em núcleo FIV (18,5%) e ID (18,6%), quando comparados, respectivamente, a citoplasma ID (13,2%) e núcleo IS (14,5%).



Figura 7. Procedimento de enucleação de zigoto para transferência pronuclear. (a-b) Aspiração do pronúcleo para o interior da pipeta “injection”; (c) pronúcleo aspirado no interior da “injection” e zigoto enucleado preso à pipeta “holding”.

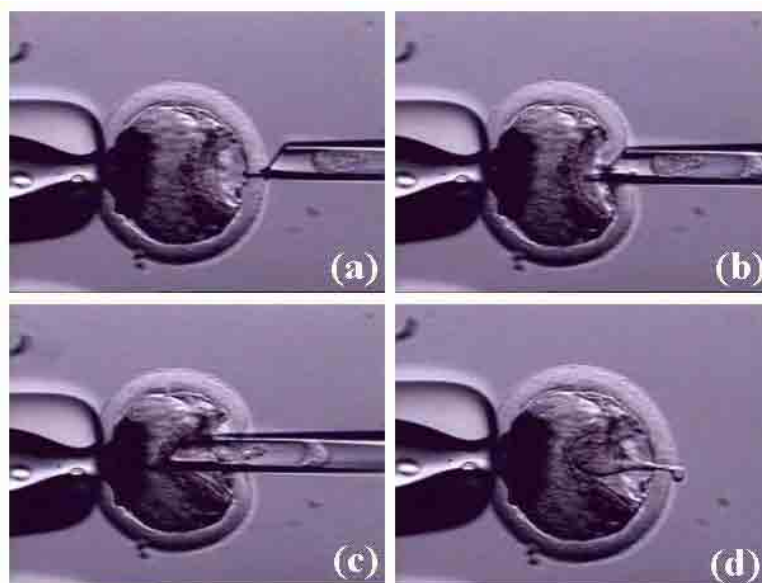


Figura 8. Procedimento de injeção do pronúcleo para transferência pronuclear. (a) Aproximação da “injection”, com um pronúcleo em seu interior, a um zigoto enucleado fixo à “holding”; (b-c) transferência do pronúcleo do interior da “injection” para o zigoto enucleado; (d) pronúcleo transferido no interior do zigoto reconstituído.

Nos diferentes experimentos, foram avaliadas as taxas de formação de pronúcleo, de 24-30h após fecundação ou ativação. Observamos que FIV (49,4%) foi superior ($P < 0,05$) a ID (43,2%) e ambos foram superiores ($P < 0,05$) a IS (39,1%; Tabela 4). Para a transferência pronuclear só foram utilizados zigotos com pronúcleos visíveis a fim de que as diferenças iniciais entre os tratamentos não afetassem as taxas de desenvolvimento posterior dos embriões.

Tabela 4. Proporção (porcentagem) de formação de pronúcleo (24-30hpf), clivagem (46-48hpf) e desenvolvimento até blastocisto (Dia 7), em embriões bovinos fecundados *in vitro* (FIV); ativados com 5µM de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID); e submetidos à transferência pronuclear, no mesmo tratamento: TP-FIV; TP-IS; TP-ID.

Tratamento	Pronúcleo	Clivagem	Blastocisto
FIV	425/860 (49,4) ^a	48/69 (69,6) ^a	15/69 (21,7) ^b
IS	1269/3242 (39,1) ^c	60/77 (77,9) ^a	6/77 (7,8) ^c
ID	826/1911 (43,2) ^b	54/65 (83,1) ^a	27/65 (41,5) ^a
TP-FIV	-	313/557 (56,2) ^b	11/505 (2,2) ^d
TP-IS	-	159/216 (73,6) ^a	14/192 (7,3) ^c
TP-ID	-	121/165 (73,3) ^a	45/142 (31,7) ^{a,b}

^{a,b,c,d}Valores com sobrescritos diferentes nas colunas, diferem entre si (P<0,05).

Os embriões-controle da técnica (TP-FIV, TP-IS e TP-ID) foram produzidos visando identificar o efeito da técnica sobre o desenvolvimento após reconstituição. As taxas de clivagem e desenvolvimento até blastocisto (Figura 9), em TP-FIV (56,2 e 2,2%), TP-IS (73,6 e 7,3%) e TP-ID (73,3 e 31,7%), foram comparadas aos respectivos controles com pronúcleos visíveis após centrifugação, FIV (69,6 e 21,7%), IS (77,9 e 7,8%) e ID (83,1 e 41,5%; Tabela 4). Observamos que, para TP-IS e TP-ID, a técnica não afetou (P>0,05) as taxas de clivagem e blastocisto. Por outro lado, os resultados obtidos em TP-FIV foram inferiores (P<0,05) a FIV.

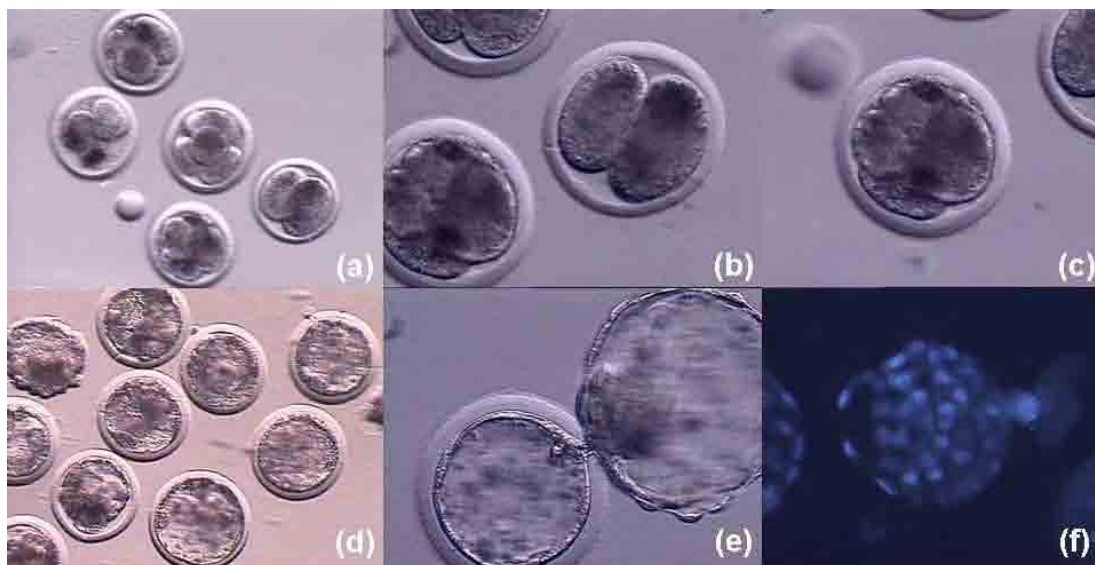


Figura 9. Embriões-controle de transferência pronuclear em zigotos ativados com ionomicina e 6-DMAP (TP-ID). (a-c) Embriões clivados nos estádios de duas a quatro células; (d) embriões nos estádios de blastocisto inicial, expandido e eclodido; (e) blastocisto em eclosão; (f) blastocisto inicial corado com 10 μ g/mL de Hoechst 33342 por 10min e visualizado sob microscópio de epifluorescência (330-385nm).

Efeito da interação núcleo-citoplasmática por transferência pronuclear sobre o desenvolvimento e o bloqueio do desenvolvimento embrionário pré-implantação

A transferência pronuclear entre zigotos ativados por IS e ID permitiu a formação dos grupos CSND e CDNS. Os embriões CSND e CDNS foram produzidos na mesma micromanipulação, por meio da utilização de duas pipetas “holdings”. Assim, um embrião IS e um ID foram fixos ao mesmo tempo e submetidos ao seguinte procedimento: os pronúcleos IS foram removidos e armazenados na pipeta “injection” (Figura 7); um pouco do meio de micromanipulação foi aspirado para o interior da pipeta (para não haver mistura dos conteúdos); os pronúcleos ID foram removidos e transferidos, imediatamente, para o citoplasma IS (zigoto IS enucleado); e, somente em seguida, o citoplasma ID recebeu os pronúcleos IS que estavam armazenados na pipeta (Figura 8).

O efeito da interação núcleo-citoplasmática foi avaliado pelas taxas de clivagem e de desenvolvimento até os estádios de oito células e blastocisto (Figura 10). Os grupos CSND (76,5 e 6,8%) e CDNS (69,5 e 4,9%) foram semelhantes ($P>0,05$) entre si e a TP-IS (73,6 e 7,3%), em clivagem e desenvolvimento até blastocisto. Em oito células, CSND (36,4%) foi semelhante ($P>0,05$), mas CDNS (25,0%) foi inferior ($P<0,05$) a TP-IS (60,0%). Por outro lado, CSND e CDNS foram inferiores ($P<0,05$) a TP-ID (68,4 e 31,7%) em desenvolvimento até oito células e blastocisto. Os embriões TP-IS e TP-ID foram semelhantes ($P>0,05$) entre si em clivagem e desenvolvimento até oito células, mas TP-IS promoveu menores ($P<0,05$) taxas de blastocisto que TP-ID (Figura 10).

Observamos que, nos tratamentos TP-IS e TP-ID, a quantidade de embriões que atingiram o estágio de oito células (60,0-68,4%) foi semelhante ($P>0,05$) ao número de clivados (73,3-73,6%), mas a redução foi significativa ($P<0,05$) até blastocisto (7,3%, em TP-IS, e 31,7%, em TP-ID). Por outro lado, nos tratamentos CSND e CDNS, houve redução significativa ($P<0,05$) tanto do estágio de duas (69,5-76,5%) para oito células (25,0-36,4%), quanto de oito células para blastocisto (4,9-6,8%; Figura 10).

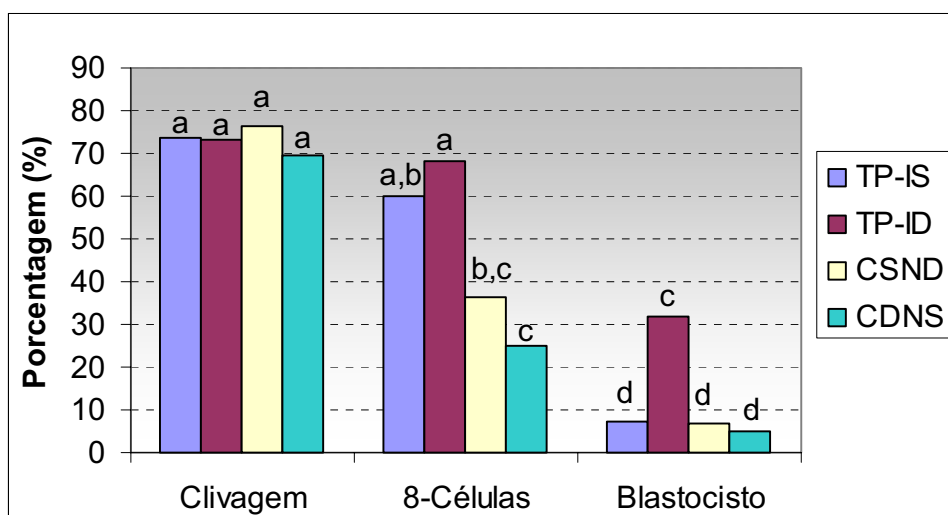


Figura 10. Porcentagem de clivagem (46-48hpf) e desenvolvimento até oito células (Dia 4) e blastocisto (Dia 7), em embriões bovinos ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID); e submetidos à transferência pronuclear, no mesmo

tratamento: TP-IS; TP-ID; e entre tratamentos: citoplasma IS e núcleo ID (CSND); citoplasma ID e núcleo IS (CDNS). ^{a,b,c,d}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$).

Discussão

Padronização das condições de centrifugação

Em bovinos, diversos protocolos de centrifugação de zigotos já foram utilizados com sucesso, tais como, 15.000xg por 3min (WESTHUSIN e De AZAMBUJA, 1996), 12.000xg/ 6min (CHAN et al., 1998), 14.000xg/ 4-8min (WALL, 2001) e 11.000xg/ 3min (LAGUTINA et al., 2004). Entretanto, em nossas condições, a utilização de 15.000 ou 18.000xg por 5min não foi suficiente para a separação adequada dos lipídeos, sendo necessária a centrifugação a 15.000xg por 15min.

Em oócitos, os cromossomos em Metáfase II foram encontrados nas quatro frações obtidas após a centrifugação (MADDOX-HYTTEL et al., 2004) e, em zigotos, os pronúcleos foram observados na região equatorial, na fração de retículo endoplasmático liso (TATHAM et al., 1996). Em nosso trabalho, encontramos os pronúcleos, com maior frequência, na fração da matriz citoplasmática, seguida pela localização na fração das vesículas e retículo endoplasmático liso.

Efeito da centrifugação sobre o desenvolvimento embrionário

Avaliamos as condições de centrifugação, visando reconhecer as influências sobre a transferência pronuclear, e observamos que não houve efeito prejudicial ao desenvolvimento nos embriões centrifugados. Isso está de acordo com a descrição de que zigotos FIV, centrifugados e transferidos a ovidutos de coelhas apresentaram taxas de desenvolvimento semelhantes aos não centrifugados (WALL e HAWK, 1988). Além desse, há relato de que, em oócitos bovinos, maturados *in vitro*, centrifugados e submetidos à fecundação *in vitro* ou ativação artificial com cálcio ionóforo, não houve efeito da centrifugação sobre o potencial de fecundação e desenvolvimento embrionário subsequente (CHUNG et al., 2001).

Os embriões FIV e IS não foram influenciados pela centrifugação, por outro lado, os embriões ID centrifugados apresentaram maiores taxas de desenvolvimento que os não centrifugados. Nesses experimentos, os zigotos foram centrifugados de 14 a 18hpf e, uma vez que a centrifugação é capaz de promover ativação dos oócitos (WALL e HAWK, 1988; CHUNG et al., 2001), podemos inferir que a centrifugação promoveu ativação daqueles oócitos que não haviam sido ativados pelo tratamento ID. Sabe-se que o 6-DMAP e o estrôncio atuam por mecanismos de ativação diferentes, enquanto o estrôncio, em camundongos, promove pulsos de cálcio semelhantes aos observados após a fecundação (BOS-MIKICH et al., 1997), o 6-DMAP inibe a fosforilação de proteínas específicas (SUSKO-PARRISH et al., 1994). Dessa maneira, a centrifugação deve atuar por um mecanismo semelhante à FIV e à ativação por IS, mas diferente e complementar à ativação promovida por ID.

A evidência de que a centrifugação promoveu ativação de oócitos não ativados no tratamento ID aliada à informação de que para os tratamentos de ativação só foram utilizados oócitos com o primeiro corpúsculo polar, enquanto que para a FIV foram utilizados todos os oócitos, sem seleção, podem justificar as menores taxas de desenvolvimento em embriões FIV comparados a ID.

Potencial de visualização e diferenciação dos pronúcleos

Para confirmar se a visualização dos pronúcleos foi possível em todos os zigotos após a centrifugação, destinamos ao cultivo os classificados como com pronúcleos ou sem eles. Observamos que alguns sem pronúcleo clivaram e atingiram o estágio de blastocisto após cultivo. Dessa maneira, dentre esses, provavelmente havia embriões que, na verdade, não possuíam pronúcleos, mas também, embriões em que os mesmos não foram visíveis, e esses foram os que progrediram no desenvolvimento. Isso demonstra que, mesmo após a centrifugação, não é possível visualizar os pronúcleos em todos os embriões e, às vezes, nem os dois pronúcleos do mesmo embrião. Esses resultados estão de acordo com evidências de que a visualização só é possível em 60% dos embriões bovinos fecundados *in vitro* e submetidos à centrifugação (WALL, 2001).

Sabemos que o 6-DMAP acelera a formação do pronúcleo (LIU et al., 1998) e isso pode explicar porque somente os oócitos submetidos ao tratamento ID apresentaram desenvolvimento superior nos zigotos classificados como com pronúcleos em comparação aos sem pronúcleos. Assim, novos estudos devem ser realizados para confirmar se os embriões classificados como sem pronúcleos, que, posteriormente, clivaram e desenvolveram-se, apresentavam pronúcleo que não foi visível no momento da avaliação ou se o pronúcleo ainda não havia sido formado.

Zigotos FIV com pronúcleos obtiveram menor taxa de desenvolvimento até blastocisto que zigotos ID. Como, em ambos os tratamentos, só foram comparados zigotos com pronúcleos, podemos excluir o efeito da seleção do corpúsculo polar entre FIV e ID. Dessa maneira, esses resultados refletem falhas ocorridas na FIV durante os experimentos. Por fatores não identificados e alheios ao nosso controle, os resultados de FIV de rotina do laboratório, em geral, apresentaram-se muito baixos, com média de 65,3% de clivagem e 16,3% de desenvolvimento até blastocisto, comprometendo, assim, o desenvolvimento dos embriões FIV.

Apesar de relatos de troca de pronúcleo masculino e feminino entre zigotos, em bovinos e ovinos, para obtenção de embriões androgenéticos e ginogenéticos (WESTHUSIN e De AZAMBUJA, 1996; HAGEMANN et al., 1998), em nosso experimento, foram raros os zigotos em que foi possível diferenciar o masculino do feminino pelo tamanho após centrifugação. Já foi descrito que as diferenças de tamanho dos pronúcleos em zigotos bovinos não são tão evidentes quanto em murinos (LAGUTINA et al., 2004). Assim, a diferenciação dos pronúcleos pelo tamanho ou pela posição (feminino próximo ao segundo corpúsculo polar ou masculino próximo à cauda do espermatozóide) pode não ser confiável e conduzir a erros, como os descritos após observação (cariotipagem e fenótipo) de zigotos murinos produzidos por transferência pronuclear (McGRATH e SOLTER, 1984a; OKAMOTO et al., 2000).

Capacidade de desenvolvimento após clivagem precoce ou tardia

Embriões que se desenvolvem mais rapidamente, possuem maior potencial de desenvolvimento até blastocisto que os mais lentos (MEIRELLES et al., 2004). Em

nossos experimentos, confirmamos essa afirmação para os embriões fecundados e observamos comportamento semelhante nos ativados, uma vez que o desenvolvimento até o estágio de blastocisto foi maior entre os embriões FIV e ID que clivaram em até 28h, quando comparados aos clivados entre 28 e 48h. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por FAVETTA et al. (2004), em embriões bovinos produzidos *in vitro*, mas, em nosso conhecimento, ainda não haviam sido observados em embriões partenogenéticos.

Avaliação da técnica de transferência pronuclear: produção de embriões-controle

Em nossos experimentos, encontramos grande dificuldade na produção dos embriões por transferência pronuclear. Como citado anteriormente, os resultados de FIV apresentaram-se muito baixos e essa queda de eficiência ocorreu nas diversas fases da produção *in vitro* de embriões: a maturação nuclear, avaliada pela extrusão do primeiro corpúsculo polar, que normalmente apresentava média de 82%, teve média de 61,1% durante os experimentos de transferência pronuclear e a formação de pronúcleos, nos oócitos ativados, foi menor que aquelas obtidas em experimentos prévios (MÉO, 2002), após maturação por 22-30h: 51,7 a 78,3%, em ID e 28,3 a 80,5%, em IS. Assim, além da micromanipulação, as falhas nas condições de cultivo podem ter comprometido, ainda mais, o desenvolvimento dos embriões reconstituídos e, por esse motivo, apesar do grande número de repetições por tratamento (7 a 11), a quantidade de embriões obtida foi pequena.

Após a centrifugação, percebemos que a visualização dos pronúcleos foi mais facilmente alcançada nos zigotos ativados em comparação aos fecundados *in vitro*. Nos ativados, predominou a formação precoce de um pronúcleo, que foi, portanto, maior e mais bem delimitado que os dois formados após a fecundação. Devido ao pequeno tamanho, antes da singamia (antes de 24hpf), os pronúcleos de zigotos FIV foram difíceis de ser visualizados, e isso pode ter dificultado a realização da transferência pronuclear nos mesmos. Por esse motivo, optou-se pela realização da técnica após a singamia, de 24 a 30hpf, para permitir o aumento do tamanho dos pronúcleos e facilitar

sua visualização. Outros autores, que realizaram transferência pronuclear mais precocemente, às 17hpf (LAGUTINA et al., 2004) e das 18-20hpf (WESTHUSIN e De AZAMBUJA, 1996), obtiveram melhores taxas de desenvolvimento.

Observamos que as taxas de formação de pronúcleos nos embriões FIV foram maiores que em ID e IS, mas isso não afetou os resultados obtidos, pois somente zigotos com pronúcleos visíveis foram utilizados nos experimentos seguintes.

Avaliamos a técnica de transferência pronuclear pelas taxas de reconstituição (76,6%), fusão (78,7%) e lise após a fusão (17,3%). Melhores taxas de fusão, de 85,1 a 90,7%, foram obtidas por WESTHUSIN e De AZAMBUJA (1996). O tipo de tratamento (FIV, ID ou IS) não afetou a reconstituição dos zigotos, evidenciando que esse parâmetro provavelmente não tenha sido influenciado pelas características dos embriões, mas sim, pelo funcionamento do sistema hidráulico de micromanipulação e pela qualidade das micropipetas utilizadas, que foram preparadas manualmente, no laboratório, e apresentaram variabilidade entre as repetições.

Nos diferentes tratamentos, as taxas de fusão foram semelhantes e demonstraram que não houve influência do tipo de citoplasma ou de núcleo utilizado. Os resultados de fusão foram superiores à média (22,4%) do laboratório para a fusão após transferência nuclear de célula somática (SCNT), utilizando fibroblasto. Isso pode ser devido à quantidade de material transferido para o espaço perivitelínico, visto que o pronúcleo é maior que o fibroblasto, e esse aumento da superfície de contato facilita a aposição entre as membranas e, conseqüentemente, a fusão.

A lise, após a fusão, foi maior nos procedimentos que envolveram a troca de pronúcleos entre tratamentos diferentes em comparação aos grupos-controle TP-IS e TP-ID. Durante os procedimentos, observamos que a lise dependeu da integridade tanto do citoplasma quanto do núcleo gerado, visto que núcleo lisado provocou lise em citoplasma íntegro após a fusão, e vice-versa. Além disso, foi influenciada, principalmente, pela qualidade da pipeta “injection”, pois quanto menor o ângulo do bixel, mais suave foi a perfuração da zona pelúcida, diminuindo a ocorrência de lise. Devido ao tamanho do pronúcleo, o diâmetro interno da “injection” para a transferência

pronuclear também teve que ser maior do que o comumente utilizado para a SCNT, em nosso laboratório.

Os embriões-controle da transferência pronuclear foram produzidos visando avaliar o efeito da técnica sobre o desenvolvimento. Como desconhecemos a origem dos oócitos, pois os ovários foram obtidos em abatedouro, e sabendo que, em camundongos, oócitos de animais diferentes podem apresentar incompatibilidade núcleo-citoplasmática (HAN et al., 2005), nos embriões-controle, os pronúcleos removidos foram transferidos novamente ao próprio embrião, isolando, assim, o efeito da técnica do efeito individual de cada oócito/animal. Esse cuidado foi tomado apesar de relato (WESTHUSIN e De AZAMBUJA, 1996) de que a transferência pronuclear entre zigotos FIV diferentes não afeta as taxas de clivagem e blastocisto, em bovinos.

Para os ativados, a técnica de transferência pronuclear não afetou o desenvolvimento, visto que os embriões TP-IS e TP-ID foram semelhantes em clivagem e blastocisto a IS e ID, respectivamente. No entanto, o mesmo não aconteceu em TP-FIV, que foi inferior a FIV. Isso reafirma as dificuldades encontradas para a realização da técnica em embriões FIV, possivelmente devido às características de formação dos pronúcleos, como relatado anteriormente. Alguns autores não encontraram efeito da técnica de transferência pronuclear sobre o desenvolvimento embrionário, com 82-90% de clivagem e 22,5-25,6% de blastocisto em embriões FIV submetidos à transferência pronuclear e 76,9% de clivagem e 22,3% de blastocisto em embriões-controle não manipulados (WESTHUSIN e De AZAMBUJA, 1996). Por outro lado, HAGEMANN et al. (1998) demonstraram diminuição na taxa de blastocisto de 72,1% em FIV-controle para 50% em FIV submetido à transferência pronuclear. Observamos que, em nossos experimentos, as taxas de clivagem e blastocisto para embriões-controle FIV (69,6 e 21,7%, respectivamente) e TP-FIV (56,2 e 2,2%, respectivamente) foram inferiores às relatadas na literatura.

Alguns blastocistos obtidos nos tratamentos FIV, IS, ID, TP-IS e TP-ID foram corados e apresentaram semelhança quanto ao número total de células (resultados não mostrados), indicando que a técnica de transferência pronuclear não afetou a qualidade dos embriões obtidos.

Efeito da interação núcleo-citoplasmática por transferência pronuclear sobre o desenvolvimento e o bloqueio do desenvolvimento embrionário pré-implantação

O estrôncio e o 6-DMAP atuam por mecanismos diferentes, enquanto o estrôncio se comporta de maneira mais fisiológica, promovendo pulsos múltiplos de cálcio (BOSMIKICH et al., 1997), o 6-DMAP inibe amplo espectro de cinases, o que pode levar a falhas do desenvolvimento (ALBERIO et al., 2001). Além disso, já foi descrito que o 6-DMAP induziu resposta mutagênica em *Salmonella typhimurium* e, por isso, pode provocar alterações genéticas quando utilizado na ativação artificial após a transferência nuclear (KATOH et al., 2004). Por esse motivo, é grande o interesse pela maior compreensão dos efeitos promovidos por esses tratamentos de ativação.

A transferência pronuclear entre zigotos IS e ID promoveu a formação dos embriões CSND e CDNS que, em clivagem, foram semelhantes entre si e aos grupos TP-IS e TP-ID. No entanto, em relação ao desenvolvimento até blastocisto, CSND e CDNS foram semelhantes entre si e ao grupo TP-IS, mas inferiores a TP-ID. Isso evidenciou que núcleo e citoplasma IS prejudicaram as taxas de desenvolvimento obtidas nos embriões ID, visto que CSND e CDNS comportaram-se como TP-IS e suas taxas de desenvolvimento não foram melhoradas pelas altas taxas obtidas em TP-ID.

A reprogramação é definida como a “dominância molecular de um tipo celular distinto sobre outro, resultando na transformação do núcleo adaptável ao tipo dominante” (JOUNEAU e RENARD, 2003). No entanto, o mecanismo responsável por esse efeito dominante ou prejudicial do tratamento IS não pôde ser compreendido, uma vez que, quando comparados entre si, os embriões CSND e CDNS comportaram-se de maneira semelhante. Esse resultado é bastante intrigante, visto que a ativação com estrôncio é considerada mais fisiológica, e, portanto, futuras investigações serão necessárias para a compreensão dessas observações.

Não sabemos se o efeito dominante/prejudicial do estrôncio foi mediado pelo citoplasma, pela ausência de núcleo e de componentes péri-nucleares ou pelo núcleo e citoplasma adjacente transferidos com o pronúcleo (carioplasto). A extensão da participação do citoplasma IS poderia esclarecida por meio da transferência de

citoplasto ativado por IS a zigotos ativados por IS e ID e de citoplasto ID para zigoto IS, de maneira semelhante à técnica utilizada, em humanos, em casos de falha persistente do desenvolvimento após FIV (COHEN et al., 1997), na qual a transferência de 10-15% de citoplasto de oócito jovem é capaz de restabelecer o desenvolvimento de oócito envelhecido. Além disso, outra abordagem seria a realização de centrifugação dos zigotos ativados e transferência de citoplasto oriundo de cada uma das quatro frações geradas, ou seja, de citoplasto enriquecido em componentes citoplasmáticos específicos.

Alguns trabalhos indicam que a origem do núcleo possui mais influência sobre o desenvolvimento do que a origem do citoplasma (LIU et al., 2001). Assim, o embrião com núcleo ID (CSND) deveria se comportar de maneira mais semelhante a TP-ID que a TP-IS. Por outro lado, não observamos tal relação entre os embriões ativados produzidos por transferência pronuclear, pois tanto citoplasma quanto núcleo IS influenciaram, e de maneira negativa, o desenvolvimento de núcleo e citoplasma ID. Há evidência de que o ooplasma, e não o núcleo, seja o principal responsável pelo estágio inicial de formação nucleolar em embriões pré-implantação (HAMILTON et al., 2004). Dessa maneira, podemos inferir que o citoplasma do oócito bovino contribui tanto quanto o núcleo para o desenvolvimento do embrião.

Em bovinos, cerca de 60-70% dos oócitos maturados *in vitro* não progridem a blastocisto, e o estágio em que os embriões param de se desenvolver (bloqueio) é variável, mas ocorre, geralmente, no momento da transição materno-zigótica, ou seja, no quarto ciclo celular ou estágio de oito células (MEIRELLES et al., 2004). O bloqueio do desenvolvimento pode ser causado por vários fatores, tais como, condições inadequadas de cultivo, anormalidades cromossômicas, “stress” oxidativo (BETTS e KING, 2001), choque térmico (RIVERA et al., 2004), presença de glicose e fosfato inorgânico no meio de cultivo (SCOTT e WHITTINGHAM, 2002), transcritos e proteínas do ciclo celular, como p27 (CIVICO et al., 2002), e proteínas da cascata de apoptose, como p57 e p66 (FAVETTA et al., 2004).

BETTS e KING (2001) propuseram um modelo, no qual morte e bloqueio embrionários, antes da fase de ativação do genoma, ocorrem por dano e encurtamento

dos telômeros e senescência, enquanto que, após o estágio de oito células, por apoptose. FAVETTA et al. (2004) observaram que a proteína relacionada ao “stress” oxidativo p66^{shc}, também envolvida na cascata de apoptose, “downstream” à p57 (proteína supressora de tumor), e na indução de senescência celular, está bastante aumentada em embriões bovinos produzidos *in vitro* que sofreram bloqueio do desenvolvimento no estágio de duas a quatro células.

Em nosso trabalho, observamos que nos tratamentos TP-IS e TP-ID, o bloqueio ocorreu principalmente entre o estágio de oito células e blastocisto e que a queda na taxa de desenvolvimento foi maior para o tratamento TP-IS que para TP-ID. Assim, podemos inferir que algum evento de apoptose possa estar sendo desencadeado, principalmente pelo tratamento de ativação com estrôncio. Por outro lado, nos tratamentos CSND e CDNS, a redução do desenvolvimento foi marcante tanto nos estágios de duas a oito células, quanto de oito células a blastocisto. Assim, a combinação entre citoplasma e núcleo de zigotos produzidos por tratamentos de ativação diferentes pode ser incompatível e levar tanto a eventos de senescência quanto de apoptose celular.

Apesar das baixas taxas de desenvolvimento até blastocisto, nos tratamentos com estrôncio, resultados obtidos em nosso laboratório (YAMAZAKI et al., 2005) demonstraram que, quando utilizado na ativação de embriões bovinos reconstituídos por SCNT, o tratamento IS promoveu maiores taxas de blastocisto (34,9%) que o tratamento ID (14,4%). Sabe-se que a apoptose ocorre por um desequilíbrio entre fatores anti e pró-apoptóticos (MEIRELLES et al., 2004). Assim, se o tratamento IS estiver afetando algum desses fatores, provavelmente a célula somática transferida por SCNT pode ter conseguido restabelecer o equilíbrio, de maneira a assegurar a sobrevivência do embrião e aumentar as taxas de desenvolvimento. Além disso, o núcleo dos embriões partenogenéticos, apesar de diploidizado artificialmente, apresenta falhas na expressão de alguns genes, principalmente dos genes “imprinted” devido à presença exclusiva de material genético de origem materna (URANGA e ARECHAGA, 1997; VAN DE VELDE et al., 1999), e, conseqüentemente, as taxas de

desenvolvimento até blastocisto podem ser comprometidas em comparação aos embriões reconstituídos por SCNT.

Outra hipótese para explicar essas diferenças é a de que núcleo meiótico (em Metáfase II), na ativação partenogenética, comporta-se de maneira diferente de núcleo somático (em fase G₀/G₁ do ciclo celular), na SCNT, frente ao tratamento de ativação por estrôncio, assim como já foi descrito para o 6-DMAP, em ovinos (ALEXANDER et al., 2006). Além disso, observamos, previamente, que, após o tratamento ID, não há separação das cromátides e o pronúcleo é formado diretamente a partir da descondensação dos cromossomos em Metáfase II (MÉO, 2002). Por outro lado, no tratamento IS suplementado com citocalasina, há, geralmente, retomada da meiose, separação das cromátides e formação de dois pronúcleos, que, posteriormente, sofrem singamia. Por esse ou algum outro motivo ainda não esclarecido, o núcleo formado após o tratamento ID pode ser mais competente que o núcleo IS em sofrer ativação do genoma e dar suporte ao desenvolvimento embrionário a partir do estágio de oito células. Dessa maneira, estudos futuros serão necessários para a compreensão desses eventos.

Experimentos de transferência pronuclear entre zigotos fecundados *in vitro* (FIV) e partenogenéticos IS e ID foram realizados (resultados não mostrados), proporcionando a formação dos embriões CFNS (citoplasma FIV e núcleo IS), CFND (citoplasma FIV e núcleo ID), CSNF (citoplasma IS e núcleo FIV) e CDNF (citoplasma ID e núcleo FIV). As taxas de clivagem e de desenvolvimento até blastocisto, respectivamente, foram de 59,8 e 1,4% para CFNS, 62,3 e 2,0% para CFND, 51,2 e 1,6% para CSNF e 51,4 e 2,7% para CDNF. Entretanto, como a transferência pronuclear em embriões FIV foi afetada pela técnica, esses resultados revelaram maior influência negativa da técnica do que possibilidade de incompatibilidade núcleo-citoplasmática entre embriões FIV e ativados e, portanto, poucas conclusões puderam ser feitas. Nesses experimentos, também observamos efeito dominante ou prejudicial do citoplasma FIV sobre o núcleo ID, nos embriões CFND.

Assim, a transferência pronuclear pode ser uma ferramenta bastante útil para a avaliação tanto da interação núcleo-citoplasmática, que ocorre imediatamente após a

fecundação, quanto dos tratamentos de ativação para posterior uso em clonagem. No experimento levado a efeito, a avaliação da interação entre zigotos fecundados e ativados foi afetada pelas falhas na transferência de pronúcleos em embriões FIV. Dessa maneira, novos estudos deverão ser realizados para aperfeiçoar a técnica de transferência pronuclear em embriões FIV, de maneira a evitar que o efeito da técnica interfira no desenvolvimento embrionário, tornando mais evidente os eventos decorrentes da interação núcleo-citoplasmática. Além disso, pesquisas deverão ser realizadas visando à identificação do efeito dominante e, ao mesmo tempo, prejudicial ao desenvolvimento, do estrôncio, que, no entanto, parece ser revertido nos embriões reconstituídos por SCNT.

Conclusões

Para a visualização dos pronúcleos, zigotos bovinos tiveram que ser centrifugados a 15.000xg por 15min em meio contendo citocalasina D.

A centrifugação não afetou o desenvolvimento posterior dos embriões.

A centrifugação não permitiu a visualização dos pronúcleos em todos os zigotos.

Houve dificuldade técnica para a diferenciação entre os pronúcleos masculino e feminino pelo tamanho, após centrifugação, em zigotos bovinos fecundados *in vitro*.

Embriões fecundados *in vitro* e ativados por ionomicina e 6-DMAP clivados em até 28h apresentaram maior potencial de desenvolvimento até blastocisto comparados aos clivados entre 28 e 48h.

A técnica de transferência pronuclear proporcionou resultados mais eficientes em embriões ativados, que formaram pronúcleo único e maior, do que em embriões fecundados.

Citoplasma e núcleo ativados por estrôncio apresentaram efeito dominante/prejudicial e afetaram as taxas de desenvolvimento de núcleo e citoplasma ativados por 6-DMAP.

Tanto o núcleo quanto o citoplasma do oócito bovino influenciam o desenvolvimento do embrião.

A transferência pronuclear entre zigotos ativados por tratamentos diferentes promoveu aumento do bloqueio do desenvolvimento entre os estádios de duas e oito células.

CAPÍTULO 4 – EXPRESSÃO DE GENES “IMPRINTED” EM FETOS BOVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO*, *IN VITRO* E PARTENOGENÉTICOS

Título

Expressão de Genes “Imprinted” em Fetos Bovinos Produzidos *in Vivo*, *in Vitro* e Partenogenéticos

Resumo

RESUMO – Genes “imprinted” participam no crescimento e desenvolvimento durante o período embrionário e fetal. Falhas em “imprints” têm causado distúrbios em animais produzidos *in vitro* e clonados. Para avaliação da expressão dos genes *IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST* e *H19*, relativa ao gene *GAPDH*, fetos bovinos e membranas cório-alantóide foram coletados aos 35-36 dias de gestação, a partir de embriões produzidos *in vivo* (TE), por fecundação *in vitro* (FIV) e por ativação partenogenética com ionomicina seguida de estrôncio (IS) ou 6-DMAP (ID). Foram recuperados 8 fetos TE, 10 FIV (41,7%), 3 IS (16,7%) e 3 ID (12,5%). Fetos menores, mas de aparência normal, inclusive das membranas, foram recuperados em ID. Entretanto, em IS, só foram obtidos fetos e membranas em degeneração. Os tecidos coletados foram submetidos à extração de RNA, transcrição reversa e avaliação de expressão gênica por PCR. Fetos e membranas ID apresentaram expressão “imprinted” de *IGF2*, contribuindo para o tamanho reduzido dos fetos, mas expressão materna de *XIST*. O cultivo *in vitro* promoveu aumento da expressão de *IGF2*, *H19* e da relação *IGF2/IGF2r*, nas membranas cório-alantóide FIV, e isso pode ter provocado o aumento do tamanho fetal, característico da Síndrome do Bezerro Gigante. Assim, a expressão desses genes “imprinted” pode ser utilizada como marcador da eficiência de sistemas de cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

Palavras-chave: “Genomic imprinting”, Membranas fetais, Partenogênese, RT-PCR

Introdução

O desenvolvimento embrionário inicia-se com a união dos gametas masculino e feminino e, visto que cada um dos genitores contribui com um conjunto haplóide de cromossomos para seus descendentes, parecia óbvio supor que a contribuição genética transmitida por ambos pais deveria ser idêntica. Entretanto, experimentos, em camundongos transgênicos e portadores de translocações cromossômicas (KENDREW, 1994; RUVINSKY, 1999) e em embriões gino e androgenéticos (SOLTER, 1988), demonstraram que a expressão de alguns genes é influenciada pela sua origem parental (materna ou paterna). Esse evento, denominado de “genomic imprinting”, ocorre somente em mamíferos eutérios e é explicado, principalmente, pela teoria do conflito entre genes maternos e paternos durante a gestação (KENDREW, 1994; RUVINSKY, 1999).

Apesar da expressão preferencial por um dos alelos parentais, há genes “imprinted” que apresentam expressão bialélica em alguns tecidos somáticos e em algumas fases do desenvolvimento, sendo, portanto, tecido e estágio específicos. Na maioria das espécies estudadas, a expressão do *XIST* (“X-inactive specific transcript”) é “imprinted” no trofoblasto e aleatória nos demais tecidos (WRENYCKI et al., 2002). Em camundongos, o *IGF2* (“insulin-like growth factor II”) é “imprinted” no mesoderma, endoderma fetal e placenta, mas ambos os alelos são expressos no sistema nervoso central (KENDREW, 1994; YOUNG e FAIRBURN, 2000) e o *MASH2* (“mammalian achaete-scute homologue 2”) é expresso na massa celular interna do blastocisto, mas se torna específico do trofoblasto após a implantação (ROSSANT et al., 1998).

A maioria dos genes “imprinted” é expressa, exclusivamente, nos estágios embrionário e neonatal ou codificam seus principais efeitos fenotípicos nessas fases (MOORE, 2001). Dentre as funções desempenhadas pelos genes “imprinted”, destacam-se: regulação do crescimento fetal, por *IGF2*, *IGF2r* (“insulin-like growth factor

II receptor”) e *H19* (WATSON et al., 1992; KENDREW, 1994; SASAKI et al., 1995; DEAN, et al., 1998); suprimento sangüíneo e formação da placenta, por *IGF2r*, *INS2* (“insulin II”) e *MASH2* (LOI et al., 1998; YOUNG e FAIRBURN, 2000) e inativação do cromossomo X, pelo *XIST* (YOUNG e FAIRBURN, 2000). Assim, esse mecanismo é de extrema importância para a vitalidade do organismo e realização plena de suas funções, e o “imprinting” anômalo pode acarretar falhas no desenvolvimento embrionário, bem como surgimento de doenças em humanos e animais.

As falhas de crescimento e desenvolvimento ocorrem naturalmente, mas em pequena escala, em todas as espécies de mamíferos. Entretanto, o uso de biotecnologias com a finalidade de reprodução assistida e obtenção de indivíduos superiores tem aumentado a incidência das anormalidades. A intensa manipulação dos embriões durante os procedimentos *in vitro*, além de exposição a diferentes temperaturas, atmosferas e meios de cultivo podem afetar o “imprinting” (DEAN et al., 1998; KONO, 1998; YOUNG e FAIRBURN, 2000). Uma vez que o estabelecimento de “imprints”, por metilação de DNA, ocorre somente nas células germinativas primordiais (SURANI, 2001), enquanto os demais genes, em bovinos, sofrem desmetilação global entre a fecundação e o estágio de 8 a 16 células (REIK et al., 2001), os genes “imprinted” podem ser mais susceptíveis que os demais às influências durante o período de pré-implantação (MOORE e REIK, 1996).

Em bovinos, a busca pela compreensão dos eventos e das decorrências do “genomic imprinting” tem sido crescente. Acredita-se que distúrbios nos genes *IGF2*, *IGF2r* e *H19* sejam responsáveis pela Síndrome do Bezerro Gigante (LOS; NIEMANN et al., 2002; RIZOS et al., 2002), que ocorre em embriões bovinos produzidos *in vitro* e em animais clonados, cultivados na presença de soro (MOORE e REIK, 1996; YOUNG e FAIRBURN, 2000).

A baixa eficiência da clonagem e a alta mortalidade dos clones podem ser causadas, em parte, pela expressão desbalanceada de alguns genes importantes para o desenvolvimento, dentre eles os “imprinted”, visto que um pré-requisito para o sucesso da transferência nuclear de célula somática, é que o padrão de metilação somático da célula doadora seja apagado e transformado em padrão embrionário sem

que os “imprints” sejam removidos (JAENISCH, 1997; MOORE, 2001). Em clones bovinos nati-mortos, foi observada expressão bialélica do gene *H19* (ZHANG et al., 2004), e a expressão do gene *XIST* foi mais afetada em clones oriundos de células adultas do que de células fetais (WRENZYCKI et al., 2002).

Atualmente, os principais obstáculos para o estabelecimento, em larga escala, de programas de produção *in vitro* de embriões bovinos e clonagem, têm sido as altas taxas de mortalidade embrionária e fetal e a elevada ocorrência de anomalias nos animais nascidos. Conseqüentemente, o estudo do “genomic imprinting” pode fornecer subsídios para a compreensão das falhas e da baixa eficiência, que, atualmente, ocorrem nos programas de biotecnologia com embriões, permitindo controlar a disseminação de indivíduos anômalos e melhorar a eficiência e a segurança desses procedimentos.

Dessa maneira, objetivamos verificar a ocorrência de “imprinting” dos genes *IGF2*, *XIST* (expressos paternos), *IGF2r*, *MASH2* e *H19* (expressos maternos) em fetos e membranas fetais (cório-alantóide) obtidos aos 35-36 dias de gestação, a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo*, *in vitro* e partenogenéticos ativados com ionomicina seguida por estrôncio ou 6-DMAP, bem como identificar a influência do cultivo *in vitro* sobre a expressão dos mesmos.

Material e Métodos

Produção *in vivo* de embriões

Para a produção *in vivo* de embriões (TE), quatro fêmeas bovinas mestiças, em condições adequadas de manejo sanitário, nutricional e reprodutivo, foram sincronizadas com progestágeno exógeno por dispositivo intravaginal (CIDR[®], Pharmacia Saúde Animal) ou implante auricular (Crestar[®], Intervet) concomitante à aspiração dos folículos acima de 6mm, em qualquer dia do ciclo estral. No 4^o. ou 5^o. dia, foi iniciada a superovulação com 200UI de FSH (Pluset[®], Calier) dividido em 8 aplicações via intramuscular (IM), a intervalos de 12h e em doses decrescentes. Na 5^a.

aplicação de FSH, foi administrado, via IM, 2mL de PGF-2 α sintética (0,5mg de Cloprostenol) (Ciosin[®], Coopers). No momento da 7^a. aplicação, o dispositivo intravaginal ou o implante auricular foi retirado. As fêmeas foram submetidas à monta natural com um touro da mesma propriedade e nas mesmas condições sanitárias, nutricionais e reprodutivas.

Produção *in vitro* de embriões

Coleta de oócitos e maturação *in vitro*

Ovários bovinos coletados em abatedouro foram transportados ao laboratório, em solução salina a 28-32°C, e seus folículos antrais de 3 a 7mm de diâmetro foram aspirados por agulha de 18-G adaptada à seringa de 20mL. O fluido folicular aspirado foi transferido para tubo cônico de 50mL e decantado por 15min para a separação dos oócitos. Posteriormente, o sedimento foi transferido para placa de Petri e visualizado em microscópio estereoscópico. Os oócitos de *cumulus* compacto ou com, pelo menos, 2 camadas de células foram selecionados e maturados *in vitro* (MIV), em grupos de 20 a 25, em gotas de 100 μ L de meio de MIV, cobertas por óleo mineral (Dow Corning 200 Fluid 50CST). O meio de MIV foi o TCM 199 com sais de Earle (Gibco 31.100), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; inativado a 55°C por 30min), 1,0 μ g/mL de FSH (Pluset[®], Calier), 50 μ g/mL de hCG (Vetecor[®], Calier), 1,0 μ g/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e 83,4 μ g/mL de amicacina (Biochimico), durante 24h à temperatura de 38,5-39°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Fecundação *in vitro*

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada 24h após o início da maturação. Os oócitos, em grupos de 20 a 25, foram dispostos em gotas de 100 μ L de meio TALP-FIV [TALP com 30 μ g/mL de heparina (Sigma H-3149), 18 μ M de penicilamina (Sigma P-4875), 10 μ M de hipotaurina (Sigma H-1384) e 1,8 μ M de epinefrina (Sigma E-4250)], suplementado com 0,2mM de piruvato, 83,4 μ g/mL de amicacina e 6mg/mL de albumina

sérica bovina (BSA; Sigma A-6003), cobertas com óleo mineral. O sêmen, congelado em palhetas de 0,5mL, foi aquecido a 35°C por 30seg e preparado por duas centrifugações a 95 xg, 5min cada, em 2mL de meio TALP-sêmen [TALP com 10mM de hepes ácido (J.T. Baker 4018-01)]. Foram recuperados 30µL do sedimento, que foram avaliados quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozóides vivos/mL com meio TALP-FIV. Posteriormente, 4µL do sêmen diluído foram adicionados às gotas contendo os oócitos, obtendo-se a concentração final de 1×10^5 espermatozóides vivos/gota (1×10^6 /mL). O período de co-incubação de oócitos e espermatozóides, a 38,5-39°C e 5% de CO₂ em ar, foi de 22-24h. Após esse período, as células do *cumulus* foram removidas por pipetagem.

Ativação partenogenética

Para a produção de embriões partenogenéticos, os oócitos, após 24h de maturação, foram desnudados em meio PBS livre de cálcio com 0,1% de álcool polivinílico (PVA; Sigma P-8136) e 0,5% de hialuronidase (pré-aquecida por 2h a 39°C; Hyalozima®, Aspen), por pipetagem durante 3-5min. Os oócitos desnudos de citoplasma homogêneo e com o primeiro corpúsculo polar foram selecionados para os tratamentos de ativação. Os tratamentos utilizados para a produção de embriões partenogenéticos diplóides foram os seguintes:

Ionomicina + Estrôncio (IS): incubação em 5µM de ionomicina (Calbiochem 407950) em meio HSOF [SOF com 5mM de bicarbonato (Mallinckrodt 7412), 10mM de hepes ácido, 10mM de hepes sódico (Sigma H-3784) e 10% de SFB] por 5min em temperatura ambiente, seguida por incubação em 20mM de estrôncio (SrCl₂; Mallinckrodt 8228) com 10µg/mL de citocalasina D (Cito D; Sigma C-8273) em meio TALP sem Ca²⁺ e Mg²⁺, por 6h, a 38,5-39°C e 5% de CO₂.

Ionomicina + 6-DMAP (ID): incubação em 5µM de ionomicina em meio HSOF por 5min em temperatura ambiente, seguida por incubação em 2mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP; Sigma D-9163) em meio TALP, por 4h, a 38,5-39°C e 5% de CO₂.

Cultivo de embriões

Após a fecundação *in vitro* ou a ativação artificial, os embriões foram submetidos ao cultivo de desenvolvimento em gotas de 100µL de meio SOF suplementado com 2,5% de SFB e 3mg/mL de BSA livre de ácidos graxos (Sigma A-8806), em co-cultivo com células da granulosa, à temperatura de 38,5-39°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar, durante 7 dias. A cada 48h, foi realizado o “feeding”, ou seja, a substituição de 50µL do meio das gotas de desenvolvimento por meio SOF recém-preparado.

Inovulação dos embriões produzidos *in vitro* e ativados

Fêmeas bovinas mestiças, em condições adequadas de manejo sanitário, nutricional e reprodutivo, foram sincronizadas com aplicação de prostaglandina exógena (PGF-2α) e avaliadas quanto à manifestação de cio após 2 ou 3 dias. Quatro receptoras foram inovuladas com 6 blastocistos de cada tratamento FIV, IS e ID (total de 12 fêmeas), obtidos após 7 dias de cultivo. Essas fêmeas foram destinadas ao abate no Frigorífico Barra Mansa, em Sertãozinho – SP, aos 35 e 36 dias de gestação.

Coleta de fetos

Na primeira repetição, as fêmeas com embriões dos tratamentos TE, FIV, ID e IS, foram abatidas aos 35 dias de gestação. Na segunda repetição, as fêmeas que repetiram cio (duas, no tratamento ID e uma, no IS) não foram abatidas, assim, somente duas fêmeas do tratamento FIV e uma do tratamento IS foram abatidas aos 36 dias de gestação. Após o abate, o trato reprodutivo foi coletado, identificado e levado ao laboratório para recuperação dos fetos e separação das membranas placentárias em saco vitelino, cório-alantóide e âmnio. Os fetos e as membranas fetais, em cada tratamento, foram coletados em Trizol (Gibco 15.596), congelados em nitrogênio líquido e armazenados a – 80°C até os procedimentos de avaliação de expressão gênica.

Avaliação de expressão gênica

Extração de RNA e transcrição reversa (RT-PCR)

Os fetos e as membranas cório-alantóide obtidos nos tratamentos TE, FIV, IS e ID foram descongelados e submetidos à extração de RNA com Trizol, segundo o protocolo do fabricante. Isoladamente, em um cadinho, a amostra foi imersa em nitrogênio líquido e pulverizada com pistilo, e o tecido resultante foi homogeneizado com 1mL de Trizol, centrifugado a 12.000xg por 10min a 4°C, acrescido de 0,2mL de clorofórmio (Merck 2445) e centrifugado novamente. O RNA foi removido da fase superior aquosa do gradiente, precipitado com 0,5mL de álcool isopropílico (Mallinckrodt 3032), lavado com etanol (Merck 1.00983) 75% e dissolvido em 200μL de água tratada com DEPC (Invitrogen 10813-012). A concentração e a pureza (razão absorvância A_{260}/A_{280}) do RNA obtido foram analisadas em Biofotômetro (Eppendorf).

Após a extração, 1μg de RNA foi destinado à transcrição reversa (RT-PCR) para obtenção de cDNA, em volume total de 20μL. A mistura de reação foi constituída de tampão 1X RT, 5mmol/L de oligo(dT) (Invitrogen 18418-012), 1,25mmol/L de cada dNTP (Eppendorf 0032.003.303), 40UI de RNase OUT (Invitrogen 10777-019) e 200UI de Superscript II (Invitrogen 18064-014). A reação foi realizada a 42°C por 50min, seguida por desnaturação a 70°C por 15min e refrigeração rápida a 4°C.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação dos genes *GAPDH* (“glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”), *IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST* e *H19* foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) específica, em termociclador Thermo Hybaid. A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores ou “primers”, utilizados para a amplificação de cada gene, a seqüência dos genes no GenBank, o tamanho dos fragmentos gerados e as referências nas quais os “primers” foram obtidos, estão descritos na Tabela 1. Os “primers” para o gene *H19* foram desenhados no Programa Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000).

Tabela 1. “Primers”, tamanho dos fragmentos gerados, sequência no GenBank e referência dos “primers” para amplificação dos genes de interesse.

Gene	“Primers” (5' → 3')	Frag. (bp)	Referência (GenBank)
<i>GAPDH</i>	GCGTGAACCACGAGAAGTATAA CCCTCCACGATGCCAAAGT	118	(AB098979)
<i>IGF2</i>	CTTCAGCCGACCATCCAGCCGCATAAAC TCAGCGGACGGTGACTCTTGGCCTCTCT	323	YASEEN et al., 2001 (X53553)
<i>IGF2r</i>	CGCCTACAGCGAGAAGGGGTTAGTC AGAAAAGCGTGACGTGCGCTTGTC	293	YASEEN et al., 2001 (JO3527)
<i>MASH2</i>	CGCTGCGCTCGGCGGTGGAGTA GGGACCCGGGCTCCGAGCTGTG	210	WRENZYCKI et al., 2001 (U77629)
<i>XIST</i>	GCATAGCACCTCGCTACCGTCTCT AACGATCATCTGCGATCCATTCTG	358	WRENZYCKI et al., 2002 (AF104906)
<i>H19</i>	GACACCCAGAACCCTCAAGA CCTTCCAGAGCTCATTCCTG	156	(AY849926)

A fase exponencial de amplificação para cada gene foi determinada em curva obtida após interrupção da reação em 6 ciclos a intervalos de 3 a 5 ciclos. Para a avaliação da expressão gênica por RT-PCR semi-quantitativo, foram utilizadas três amostras de cada tecido (feto e cório-alantóide) nos tratamentos TE e FIV, duas, em ID, e uma amostra de cório-alantóide, em IS, que foram analisadas em três repetições. Para cada gene, a reação de PCR foi realizada em volume de 20µL e a concentração final dos componentes e as condições de termociclagem estão descritas, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3. Em todas as reações, foi realizado tubo-controle negativo sem DNA.

Tabela 2. Concentração final dos componentes utilizados na reação de PCR para amplificação dos genes de interesse.

Gene	Tampão ^a (X)	“Primer” ^b (µM)	Mg ^a (mM)	dNTP ^a (mM)	Taq DNA Polimerase ^a (U)	DNA (ng)
<i>GAPDH</i>	1	0,25	3,75	0,50	0,40	50
<i>IGF2</i>	1	0,20	1,50	0,20	0,40	50
<i>IGF2r</i>	1	0,50	1,50	0,20	0,40	50
<i>MASH2</i>	1	0,50	1,50	0,20	0,40	50
<i>XIST</i>	1	0,50	1,50	0,20	0,40	50
<i>H19</i>	1	0,25	1,50	0,20	0,40	50

^aMaster Mix, Eppendorf (0032.002.250); ^bInvitrogen

Tabela 3. Condições de termociclagem utilizadas na PCR para amplificação dos genes de interesse.

Etapa	<i>GAPDH</i>	<i>IGF2</i>	<i>IGF2r</i>	<i>MASH2</i>	<i>XIST</i>	<i>H19</i>
Inicial	94°C/30seg	97°C/2min	97°C/2min	97°C/2min	97°C/2min	97°C/2min
Ciclos	40	30	38	38 ^a , 43 ^b	34 ^a , 40 ^b	30
Desnaturação	94°C/30seg	95°C/30seg	95°C/30seg	95°C/30seg	95°C/30seg	95°C/30seg
Anelamento	60-54°C/ 30seg (-2°C/10c)	69-63°C/ 30seg (-2°C/7-8c)	58°C/30seg	64°C/30seg	63°C/30seg	58°C/30seg
Extensão	72°C/45seg	72°C/30seg	72°C/30seg	72°C/30seg	72°C/30seg	72°C/30seg
Extensão final	72°C/10min	72°C/5min	72°C/10min	72°C/10min	72°C/10min	72°C/10min

^aFeto; ^bMembrana cório-alantóide. c: ciclos.

Eletroforese e expressão gênica relativa

A eletroforese foi realizada em gel de agarose (Invitrogen 15510-019) a 1,5%, preparado com tampão TBE 1X [8,9mM tris-base (Plusone 17-1321-01), 8,9mM ácido bórico (Acros 10043-35-3) e 2,8mM EDTA (Sigma E-6758)]. A cada 9µL de amostra obtida na PCR foi acrescentado 1µL de tampão de carregamento [0,25% xilenocianol (Sigma X-4126) e 30% glicerol (Merck 104094)]. Em cada corrida, foi aplicado o padrão de peso ou “ladder” com fragmentos de DNA de 100bp (0,025µg/µL; Invitrogen 15628-019). A corrida foi realizada em cuba de eletroforese com tampão TBE 1X a 80-90 V por, aproximadamente, 35min.

O gel foi lido em transiluminador UV de 302nm e a imagem obtida, digitalizada no Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software (Versão 3.0). A amplificação do gene de interesse foi confirmada pela comparação do tamanho da banda obtida ao tamanho esperado (*GAPDH* – 118bp, *IGF2* – 323bp, *IGF2r* – 293bp, *XIST* – 358bp, *MASH2* – 210bp e *H19* – 156bp) e ao padrão de peso. A densidade de cada banda foi determinada por densitometria com a ferramenta “net intensity” (soma dos valores em pixel subtraídos do “background”, no retângulo da banda) do programa de análise de imagem acima mencionado. A quantidade relativa do RNAm de interesse foi calculada pela divisão da intensidade da banda do gene-alvo pela intensidade da banda do *GAPDH* (gene de expressão constitutiva) da mesma amostra.

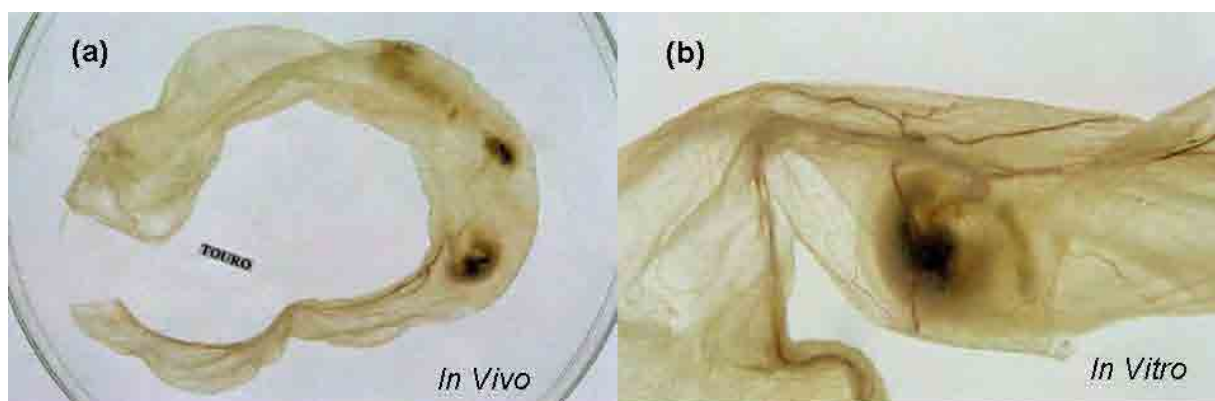
Análise estatística

As taxas de gestação aos 35-36 dias foram avaliadas pelo teste de χ^2 . Os resultados de expressão gênica foram submetidos à ANOVA e teste de comparação de médias de Tukey, no SAS (Versão 8.2), para determinar diferenças entre amostras e tratamentos. Foi utilizado nível de significância de 5%.

Resultados

Fetos produzidos *in vivo*, *in vitro* e partenogenéticos

Na primeira repetição, aos 35 dias de gestação, foram recuperados 6 fetos de uma fêmea e 2 de outra, no tratamento TE; 4 fetos, em FIV; e 3 fetos, em ID. As demais receptoras haviam manifestado cio e encontravam-se vazias no momento do abate. No tratamento IS, não foram recuperados fetos, pois uma fêmea repetiu cio e a outra não foi abatida por determinação do proprietário dos animais. As fotos dos fetos e das membranas fetais TE e FIV estão demonstradas na Figura 1.



Fotografias cedidas pela equipe da Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino

Figura 1. Visão macroscópica de fetos e membranas fetais obtidos aos 35 dias de gestação. (a) Produção *in vivo* de embriões (TE) por superovulação de receptoras seguida de monta natural; (b) produção *in vitro* de embriões por in ovulação, em fêmeas previamente sincronizadas, de 6 blastocistos de 7 dias produzidos por fecundação *in vitro* (FIV).

Na segunda repetição, as duas fêmeas do tratamento ID e uma do tratamento IS manifestaram cio e não foram abatidas. Assim, aos 36 dias de gestação foram obtidos, no tratamento FIV, 5 fetos de uma fêmea e 1 de outra e, no tratamento IS, 3 fetos, que apresentaram desenvolvimento retardado com membranas fetais em degeneração (Figuras 2 e 3).

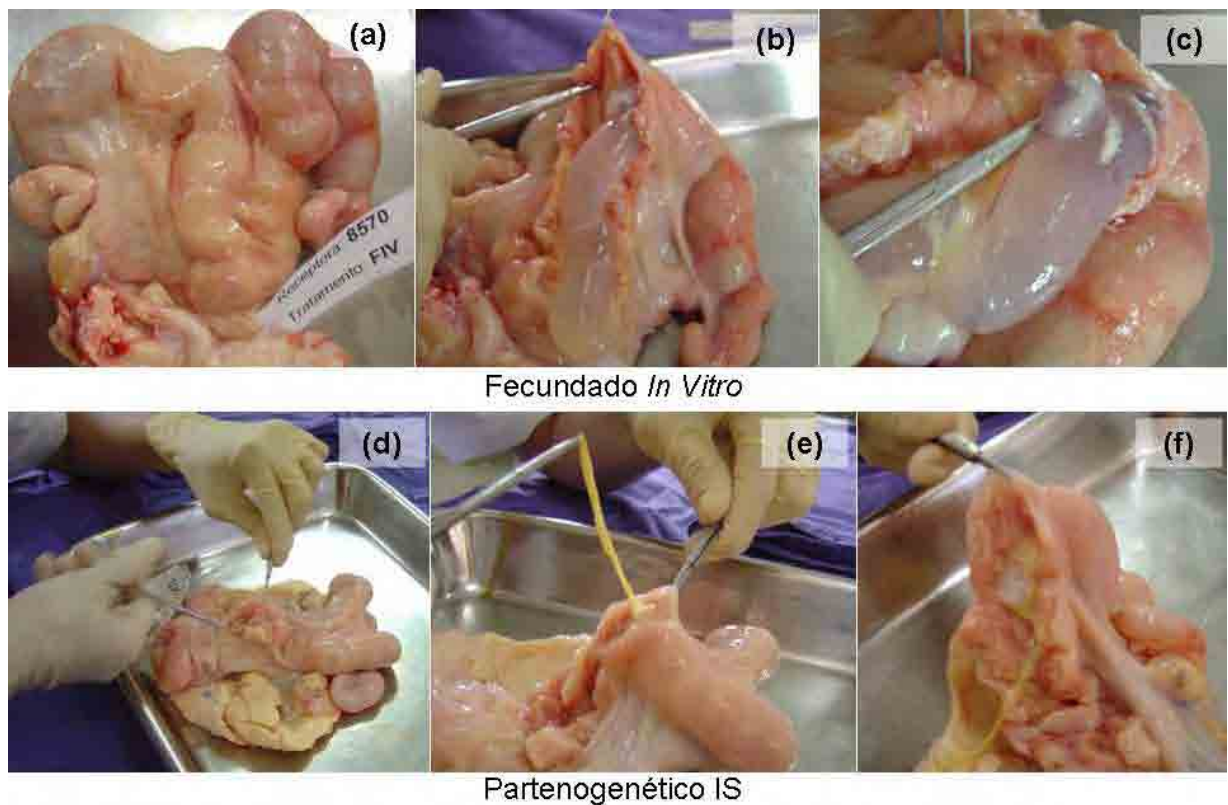


Figura 2. Coleta de fetos e membranas fetais, aos 36 dias de gestação, após inovulação, em fêmeas previamente sincronizadas, de 6 blastocistos de 7 dias produzidos por (a-c) fecundação *in vitro* (Fecundado *in vitro*; FIV) e (d-f) ativação artificial com 5 μ M de ionomicina por 5min e 20mM de estrôncio por 6h (Partenogenético IS; IS).

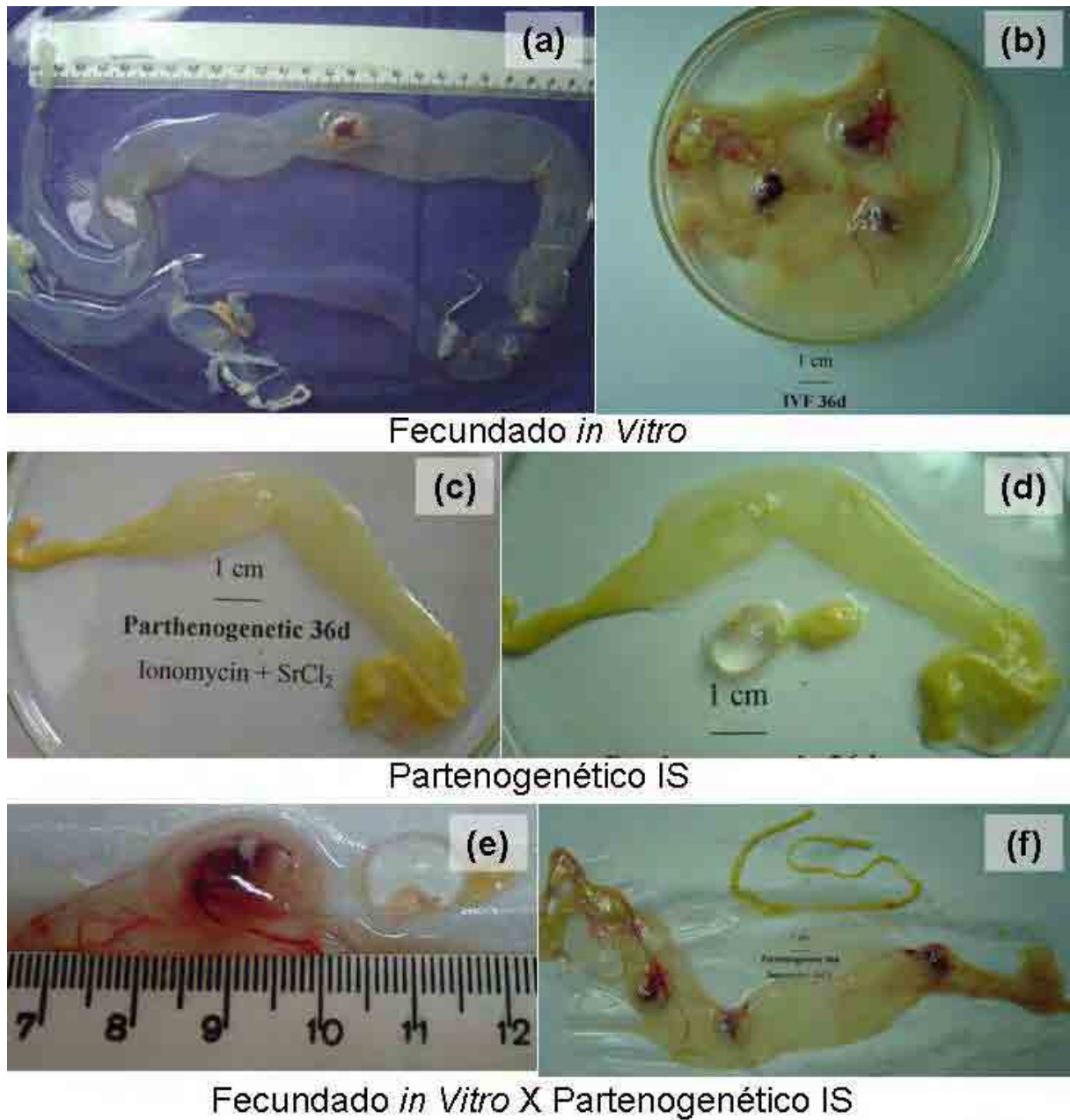


Figura 3. Fetos e membranas fetais coletados aos 36 dias de gestação, após inovulação, em fêmeas previamente sincronizadas, de 6 blastocistos de 7 dias produzidos por (a-b) fecundação *in vitro* (Fecundado *in vitro*; FIV3) e (c-d) ativação artificial com 5 μ M de ionomicina por 5min e 20mM de estrôncio por 6h (Partenogenético IS; IS). (e-f) Comparação entre fetos e membranas fetais produzidos por FIV e IS.

Nas duas repetições, as taxas de gestação aos 35-36 dias foram de 41,7% para FIV (10/24; n=4); 16,7% para IS (3/18; n=3) e 12,5% para ID (3/24; n=4). As taxas de gestação para os embriões FIV foram semelhantes ($P>0,05$) a IS e superiores ($P<0,05$) a ID.

Extração de RNA

As amostras de fetos e membranas cório-alantóide obtidas nos tratamentos TE, FIV, IS e ID foram descongeladas (Figura 4) e submetidas à extração de RNA com Trizol. Observamos, após descongelação, que o feto FIV1 apresentou maior tamanho que o feto TE1 (Figura 4).



Figura 4. (a-c) Fetos e (d-f) membranas cório-alantóide coletados aos 35 dias de gestação, após (a,d) produção *in vivo* (TE1) de embriões por superovulação de receptoras seguida de monta natural; ou inovulação, em fêmeas previamente sincronizadas, de 6 blastocistos de 7 dias produzidos por (b,e) fecundação *in vitro* (FIV1) ou (c,f) ativação artificial com 5 μ M de ionomicina por 5min e 2mM de 6-DMAP por 4h (ID2).

Expressão gênica relativa

Os testes para determinação da fase exponencial de amplificação para os genes *GAPDH*, *IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST* e *H19* foram realizados nas amostras de feto e cório-alantóide coletadas aos 35 dias de gestação de embrião bovino produzidos *in vivo* (TE2) e estão demonstrados na Figura 5.

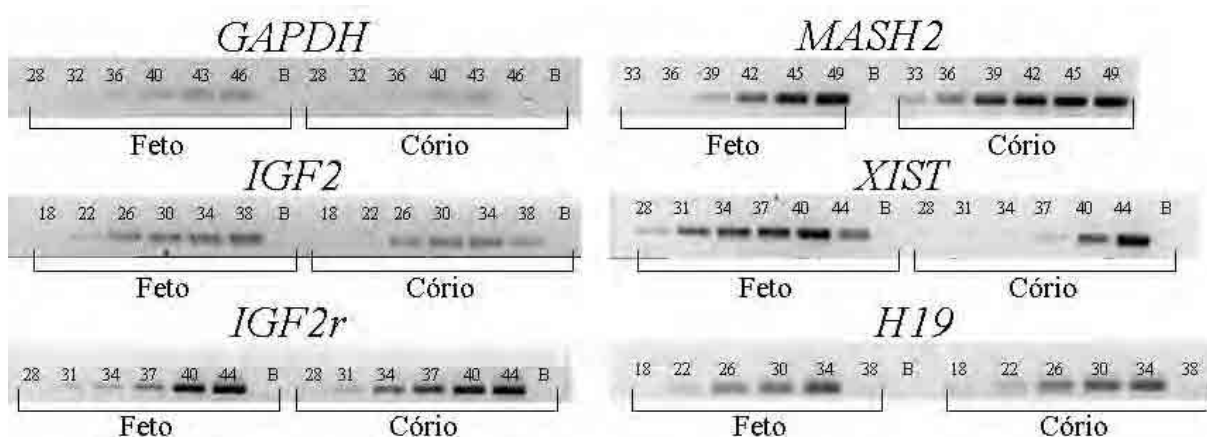


Figura 5. Determinação da fase de amplificação exponencial dos genes *GAPDH*, *IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST* e *H19*, nas amostras de feto e membrana cório-alantóide (cório) coletadas aos 35 dias de gestação a partir de embrião bovino produzidos *in vivo* (amostra 2; TE2), por interrupção da reação em cadeia da polimerase (PCR) a intervalos de 3 a 5 ciclos (de 18 a 49 ciclos). B: amostra-controle sem DNA.

O padrão de bandas, em gel de agarose corado com brometo de etídeo (Figura 6), e os resultados de expressão dos genes *IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST* e *H19*, relativa ao gene *GAPDH*, para os fetos, estão descritos na Tabela 4 e expressos nas Figuras 7 e 8, e para as membranas cório-alantóide, na Tabela 5 e nas Figuras 9 e 10.

Não foi possível o isolamento de RNA das amostras de feto IS, pois após a PCR, só foi observada amplificação de DNA genômico (banda de tamanho maior que o esperado para os genes em estudo; resultados não mostrados).

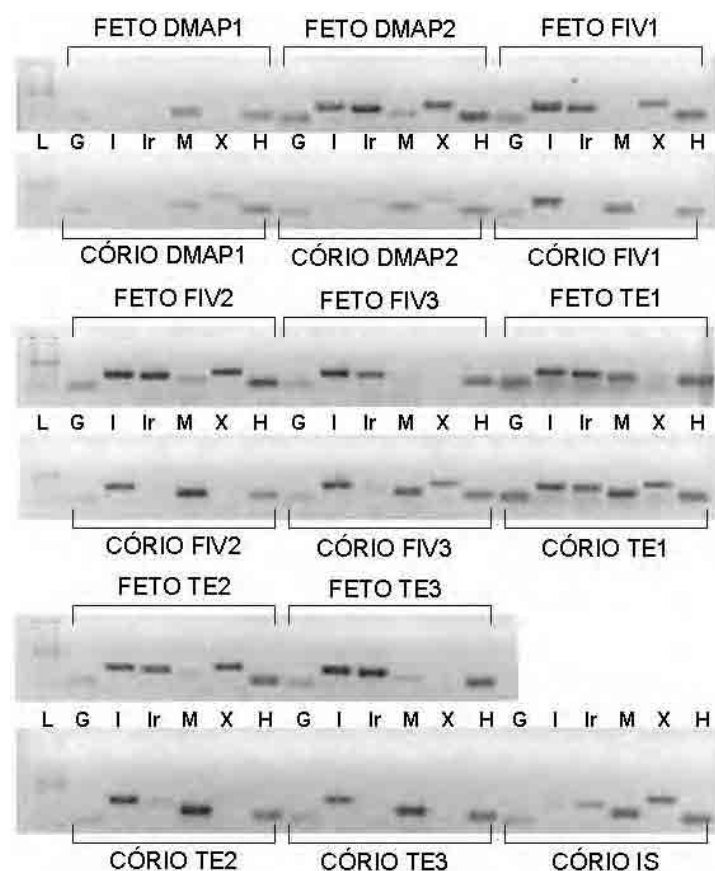


Figura 6. Padrão de bandas, em gel de agarose corado com brometo de etídeo, do “ladder” de 100bp (L) e dos genes *GAPDH* (G), *IGF2* (I), *IGF2r* (Ir), *MASH2* (M), *XIST* (X) e *H19* (H), nas amostras de feto e membranas cório-alantóide (cório) coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo* (TE); fecundados *in vitro* (FIV) ou ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID).

Amostras de fetos

Nos fetos, observamos que os genes *IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST* e *H19* foram expressos em todas as amostras, exceto nos fetos ID1 (ausência de expressão de *IGF2*, *IGF2r* e *XIST*) e TE1 (*XIST*) (Figura 7; Tabela 4). Os fetos TE e ID, diferente dos fetos FIV, apresentaram marcante ($P < 0,05$) variação individual para os genes *IGF2*, *IGF2r* e *XIST* (Tabela 4).

Para o gene *IGF2*, a expressão nos fetos TE3, FIV1 e FIV3 foi superior ($P < 0,05$) a TE1 e ID1, e TE2, FIV2 e ID2 foram superiores ($P < 0,05$) a ID1. Para o gene *IGF2r*, a

expressão no feto TE3 foi superior ($P < 0,05$) a TE1 e ID1, e TE2, FIV1, FIV2, FIV3 e ID2 foram superiores ($P < 0,05$) a ID1. Não houve variação ($P > 0,05$) na expressão de *MASH2*, entre os fetos TE, FIV e ID. O gene *XIST* foi mais expresso ($P < 0,05$) no feto TE2 em comparação a TE1, TE3 e ID1, enquanto FIV1, FIV2, FIV3 e ID2 foram superiores ($P < 0,05$) a TE1 e ID1. Para o gene *H19*, a expressão no feto ID1 foi superior ($P < 0,05$) a TE1 e TE3, os demais fetos foram semelhantes ($P > 0,05$) entre si (Tabela 4).

FETO	TE1	TE2	TE3	FIV1	FIV2	FIV3	ID1	ID2
	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
<i>IGF2</i>								
<i>IGF2r</i>								
<i>MASH2</i>								
<i>XIST</i>								
<i>H19</i>								
<i>GAPDH</i>								

Figura 7. Padrão de bandas, em gel de agarose corado com brometo de etídeo, das três repetições de amplificação dos genes *IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST*, *H19* e *GAPDH*, nas amostras de feto coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo* (TE); fecundados *in vitro* (FIV) ou ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min e 2mM de 6-DMAP por 4h (ID).

Tabela 4. Média ($\pm$ desvio padrão) das relações entre a intensidade da banda do gene-alvo (*IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST* e *H19*) e a intensidade da banda do gene de expressão constitutiva *GAPDH* (GAP), em cada amostra de feto coletada aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo* (TE); fecundados *in vitro* (FIV) e ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min e 2mM de 6-DMAP por 4h (ID).

Am.	<i>IGF2</i> /GAP	<i>IGF2r</i> /GAP	<i>MASH2</i> /GAP	<i>XIST</i> /GAP	<i>H19</i> /GAP
TE 1	0,89 $\pm$ 0,18 ^{b,c}	0,81 $\pm$ 0,09 ^{b,c}	0,57 $\pm$ 0,18 ^a	0 ^c	1,14 $\pm$ 0,04 ^b
TE 2	1,92 $\pm$ 0,40 ^{a,b}	1,76 $\pm$ 0,44 ^{a,b}	0,61 $\pm$ 0,14 ^a	1,79 $\pm$ 0,45 ^a	1,53 $\pm$ 0,29 ^{a,b}
TE 3	2,15 $\pm$ 0,58 ^a	1,99 $\pm$ 0,54 ^a	0,77 $\pm$ 0,19 ^a	0,78 $\pm$ 0,47 ^{b,c}	1,29 $\pm$ 0,04 ^b
FIV 1	2,10 $\pm$ 0,27 ^a	1,43 $\pm$ 0,27 ^{a,b}	0,64 $\pm$ 0,22 ^a	1,18 $\pm$ 0,21 ^{a,b}	1,57 $\pm$ 0,22 ^{a,b}
FIV 2	1,51 $\pm$ 0,44 ^{a,b}	1,68 $\pm$ 0,28 ^{a,b}	0,78 $\pm$ 0,06 ^a	1,46 $\pm$ 0,06 ^{a,b}	1,52 $\pm$ 0,15 ^{a,b}
FIV 3	2,09 $\pm$ 0,52 ^a	1,73 $\pm$ 0,53 ^{a,b}	0,51 $\pm$ 0,19 ^a	1,31 $\pm$ 0,55 ^{a,b}	1,68 $\pm$ 0,49 ^{a,b}
ID 1	0 ^c	0 ^c	0,51 $\pm$ 0,22 ^a	0 ^c	2,10 $\pm$ 0,27 ^a
ID 2	1,15 $\pm$ 0,26 ^{a,b}	1,56 $\pm$ 0,56 ^{a,b}	0,75 $\pm$ 0,19 ^a	1,49 $\pm$ 0,20 ^{a,b}	1,42 $\pm$ 0,09 ^{a,b}

^{a,b,c}Valores com sobrescritos diferentes nas colunas, diferem entre si ($P < 0,05$).

Apesar da variação individual entre amostras, elas foram agrupadas nos tratamentos principais em TE, FIV e ID (Figura 8). Observamos que o gene *IGF2* foi mais ($P<0,05$) expresso em fetos TE e FIV que em ID. Para o *IGF2r*, FIV foi superior ($P<0,05$) a ID e semelhante ($P>0,05$) a TE. A expressão de *MASH2* e *XIST* foi semelhante ($P>0,05$) entre os tratamentos. Para o gene *H19*, os fetos ID foram superiores ($P<0,05$) a TE e semelhantes ($P>0,05$) a FIV (Figura 8).

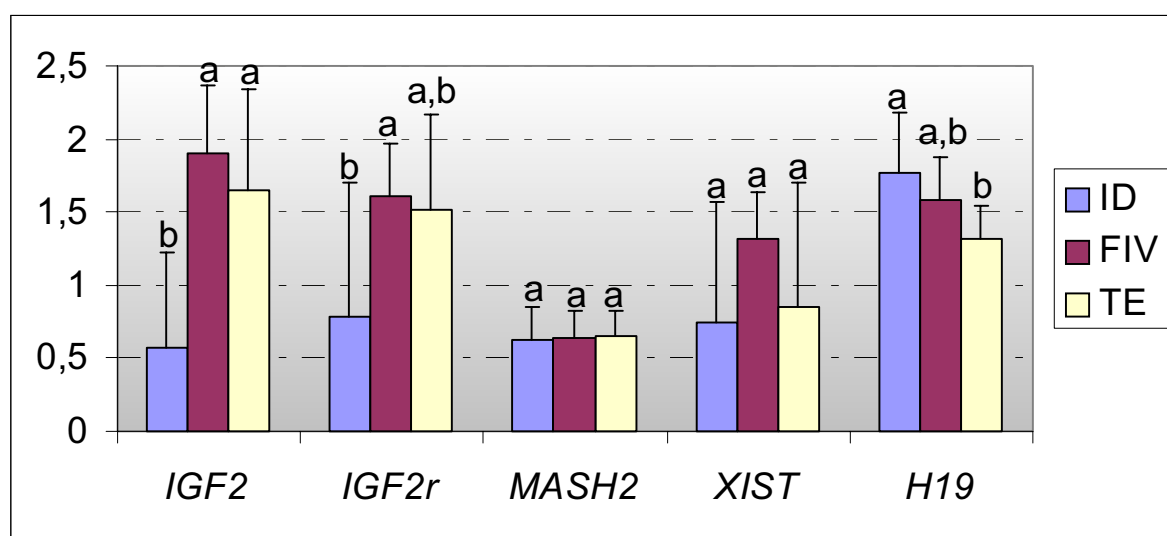


Figura 8. Média (e desvio padrão) das relações entre a intensidade da banda do gene-alvo (*IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST* e *H19*) e a intensidade da banda do gene de expressão constitutiva *GAPDH*, nas amostras de feto coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo* (TE; n=3); fecundados *in vitro* (FIV; n=3) e ativados com 5µM de ionomicina por 5min e 2mM de 6-DMAP por 4h (ID; n=2). ^{a,b}Colunas com sobrescritos diferentes, no mesmo gene, diferem entre si ($P<0,05$).

Amostras de membranas cório-alantóide

Nas amostras de membranas cório-alantóide, observamos que os genes *MASH2* e *H19* foram expressos em todas as amostras, e só não houve expressão de *IGF2* em ID1; de *IGF2r* em TE3 e FIV1; e de *XIST* em TE3, FIV1 e FIV2. Houve variação individual ($P<0,05$) nos fetos TE e FIV para os genes *IGF2*, *IGF2r* e *MASH2*; e nos fetos ID para o gene *MASH2* (Figura 9; Tabela 5).

Para o gene *IGF2*, a expressão em FIV2 foi superior ($P<0,05$) a TE1, TE2, TE3, FIV3, IS, ID1 e ID2; em FIV1, a expressão foi superior ($P<0,05$) a TE1, IS, ID1 e ID2, enquanto TE2 e FIV3 foram superiores ($P<0,05$) a TE1, IS, ID1 e ID2. Para o gene *IGF2r*, a expressão em TE1, TE2, FIV2, FIV3, IS, ID1 e ID2 foram superiores ($P<0,05$) a TE3 e FIV1. A expressão do gene *MASH2* em FIV foi semelhante ($P>0,05$) a TE2 e ID1 e superior aos demais; TE2 foi superior ($P<0,05$) a TE1, FIV3, IS e ID2; enquanto ID1 foi superior ($P<0,05$) a TE1 e ID2. O gene *XIST* foi mais expresso ($P<0,05$) em IS e ID2 comparado a TE2, TE3, FIV1 e FIV2, enquanto ID1 foi superior ($P<0,05$) TE3, FIV1 e FIV2. Para o gene *H19*, a expressão em FIV1 e FIV foi superior ($P<0,05$) a TE1 (Tabela 5).

CÓRIO	TE1			TE2			TE3			FIV1			FIV2			FIV3			IS			ID1			ID2		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>IGF2</i>																											
<i>IGF2r</i>																											
<i>MASH2</i>																											
<i>XIST</i>																											
<i>H19</i>																											
<i>GAPDH</i>																											

Figura 9. Padrão de bandas, em gel de agarose corado com brometo de etídeo, das três repetições de amplificação dos genes *IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST*, *H19* e *GAPDH*, nas amostras de membranas cório-alantóide coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo* (TE); fecundados *in vitro* (FIV) e ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID).

Tabela 5. Média ($\pm$ desvio padrão) das relações entre a intensidade da banda do gene-alvo (*IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST* e *H19*) e a intensidade da banda do gene de expressão constitutiva *GAPDH* (GAP), em cada amostra de membrana cório-alantóide coletada aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo* (TE); fecundados *in vitro* (FIV) e ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID).

Am.	<i>IGF2</i> /GAP	<i>IGF2r</i> /GAP	<i>MASH2</i> /GAP	<i>XIST</i> /GAP	<i>H19</i> /GAP
TE 1	1,06 $\pm$ 0,16 ^c	0,95 $\pm$ 0,11 ^a	1,27 $\pm$ 0,13 ^d	0,69 $\pm$ 0,21 ^{a,b,c}	1,24 $\pm$ 0,28 ^b
TE 2	3,47 $\pm$ 1,21 ^b	0,83 $\pm$ 0,10 ^a	4,54 $\pm$ 0,92 ^{a,b}	0,38 $\pm$ 0,03 ^{b,c}	2,48 $\pm$ 0,51 ^{a,b}
TE 3	2,05 $\pm$ 0,80 ^{b,c}	0 ^b	3,07 $\pm$ 0,96 ^{b,c,d}	0 ^c	2,19 $\pm$ 0,56 ^{a,b}
FIV 1	3,72 $\pm$ 0,76 ^{a,b}	0 ^b	3,13 $\pm$ 0,47 ^{b,c,d}	0 ^c	3,46 $\pm$ 0,55 ^a
FIV 2	5,85 $\pm$ 1,43 ^a	0,68 $\pm$ 0,17 ^a	5,16 $\pm$ 0,83 ^a	0 ^c	3,30 $\pm$ 0,96 ^a
FIV 3	3,37 $\pm$ 1,06 ^b	0,75 $\pm$ 0,16 ^a	2,04 $\pm$ 0,51 ^{c,d}	0,87 $\pm$ 0,40 ^{a,b,c}	2,85 $\pm$ 0,48 ^{a,b}
IS	0,25 $\pm$ 0,07 ^c	0,76 $\pm$ 0,35 ^a	1,63 $\pm$ 0,91 ^{c,d}	1,76 $\pm$ 0,88 ^a	1,96 $\pm$ 0,74 ^{a,b}
ID 1	0 ^c	0,75 $\pm$ 0,10 ^a	3,54 $\pm$ 0,58 ^{a,b,c}	1,40 $\pm$ 0,47 ^{a,b}	2,61 $\pm$ 0,51 ^{a,b}
ID 2	0,46 $\pm$ 0,09 ^c	0,74 $\pm$ 0,11 ^a	1,56 $\pm$ 0,40 ^d	1,67 $\pm$ 0,27 ^a	2,41 $\pm$ 0,65 ^{a,b}

^{a,b,c,d}Valores com sobrescritos diferentes nas colunas, diferem entre si (P<0,05).

Apesar da observação de variação entre amostras de membranas cório-alantóide, elas foram agrupadas nos tratamentos TE, FIV e ID. Constatamos que para o gene *IGF2*, FIV foi superior (P<0,05) a TE, IS e ID, enquanto TE foi superior (P<0,05) a ID. A expressão dos genes *IGF2r* e *MASH2*, foi semelhante (P>0,05) entre os tratamentos. A expressão de *XIST* em IS e ID foi superior (P<0,05) a TE e FIV. Para o gene *H19*, FIV foi superior (P<0,05) a TE e IS (Figura 10).

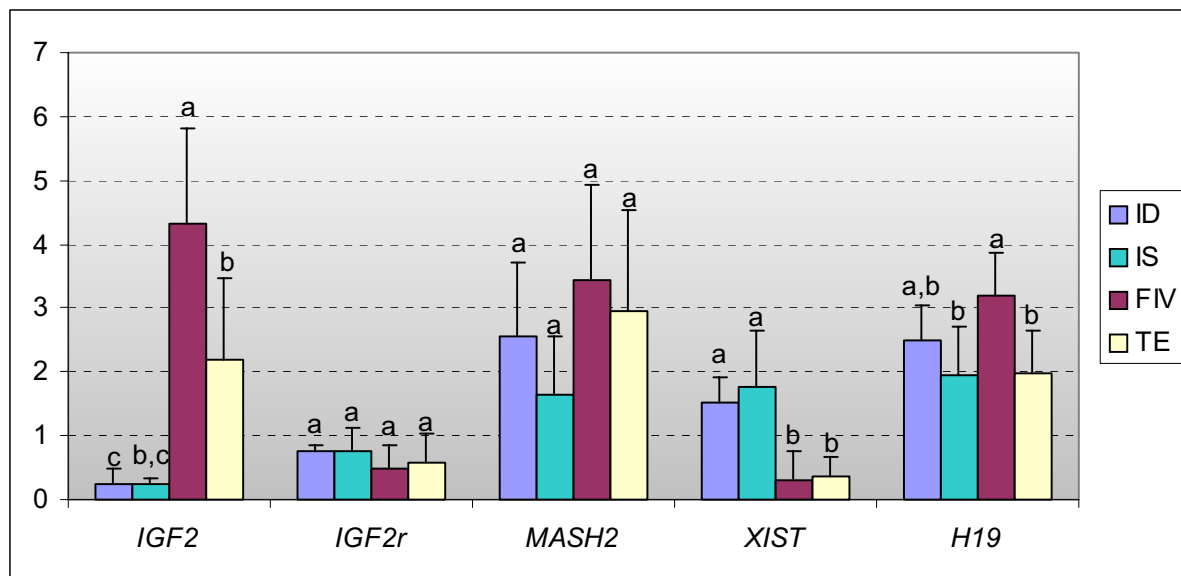


Figura 10. Média (e desvio padrão) das relações entre a intensidade da banda do gene-alvo (*IGF2*, *IGF2r*, *MASH2*, *XIST* e *H19*) e a intensidade da banda do gene de expressão constitutiva *GAPDH*, das amostras de membrana cório-alantóide coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo* (TE; n=3); fecundados *in vitro* (FIV; n=3) e ativados com 5μM de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS; n=1) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID; n=2). ^{a,b,c}Colunas com sobrescritos diferentes, no mesmo gene, diferem entre si (P<0,05).

Relações dos padrões de expressão de *IGF2*, *IGF2r* e *H19*

Uma vez que os genes *IGF2*, *IGF2r* e *H19* são considerados os principais responsáveis pela Síndrome do Bezerro Gigante, as relações entre seus padrões de expressão foram comparadas entre fetos (Tabela 6) e membranas cório-alantóide (Tabela 7), nos tratamentos TE, FIV, IS e ID.

Nas amostras de feto, observamos que todas as relações avaliadas (*IGF2/H19*, *IGF2/IGF2r* e *IGF2r/H19*) foram maiores que 1 para TE e FIV e menores que 1 para ID (Tabela 6).

Tabela 6. Relação entre a intensidade das bandas dos genes *IGF2*, *IGF2r* e *H19*, em amostras de feto coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo* (TE; n=3); fecundados *in vitro* (FIV; n=3) e ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min e 2mM de 6-DMAP por 4h (ID; n=2).

Tratamento	<i>IGF2/H19</i>	<i>IGF2/IGF2r</i>	<i>IGF2r/H19</i>
TE	1,25	1,09	1,15
FIV	1,20	1,18	1,01
ID	0,33	0,74	0,44

Nas amostras de membrana cório-alantóide, observamos que, semelhante aos fetos, as relações *IGF2/H19* e *IGF2/IGF2r* foram maiores que 1 para TE e FIV e menores que 1 para IS e ID. No entanto, a relação *IGF2/H19* manteve-se menor que 1 entre os tratamentos. Grande alteração foi observada na relação *IGF2/IGF2r*, em FIV (Tabela 7).

Tabela 7. Relação entre a intensidade das bandas dos genes *IGF2*, *IGF2r* e *H19*, em amostras de membranas cório-alantóide coletadas aos 35-36 dias de gestação a partir de embriões bovinos produzidos *in vivo* (TE; n=3); fecundados *in vitro* (FIV; n=3) e ativados com 5 μ M de ionomicina por 5min seguida por 20mM de estrôncio por 6h (IS; n=1) ou 2mM de 6-DMAP por 4h (ID; n=2).

Tratamento	<i>IGF2/H19</i>	<i>IGF2/IGF2r</i>	<i>IGF2r/H19</i>
TE	1,11	3,70	0,30
FIV	1,35	9,05	0,15
IS	0,13	0,33	0,39
ID	0,09	0,31	0,30

Discussão

Para avaliação de expressão gênica, tínhamos como objetivo acompanhar a progressão do desenvolvimento e, por isso, foram realizadas coletas aos 18 e 35-36 dias de gestação. Entretanto, em nenhum dos tratamentos foram observados fetos aos 18 dias (resultados não mostrados). Uma vez que corpos lúteos estavam presentes, nos ovários das receptoras, mas nenhum feto foi recuperado, podemos inferir que a técnica de dissecação do trato reprodutivo não foi adequada para a coleta de fetos dessa

idade e que, provavelmente, seria necessária a realização de lavagem do trato, seguida por visualização do lavado sob microscópio estereoscópico.

Desenvolvimento de embriões partenogênicos

Embriões partenogênicos não progridem a termo, mas há relatos de prolongamento da duração do ciclo estral de 32 dias, em 31,8% das fêmeas (SUSKO-PARRISH et al., 1994), até 48 dias (FUKUI et al., 1992) após inovulação de embriões partenogênicos em receptoras bovinas. Além disso, uma receptora (25% de gestação) foi diagnosticada gestante por ultra-sonografia aos 35 dias, apesar do útero grávidico parecer menor que o normal e não serem detectados batimentos cardíacos (FUKUI et al., 1992). Observamos taxas de gestação (12,5-16,7%) inferiores às descritas acima, possivelmente por essas terem sido calculadas após coleta dos fetos e não por observação de prolongamento do ciclo estral ou avaliação ultra-sonográfica.

Em ovinos, aos 21 dias, foram obtidas taxas de gestação semelhantes entre embriões partenogênicos (60%) e produzidos *in vivo* (63,6%; FEIL et al., 1998). Em nosso trabalho, a semelhança nas taxas de gestação entre os grupos IS (16,7%) e FIV (41,7%) pode ter sido favorecida pelo baixo número de transferências realizadas e de fetos obtidos.

Acreditamos apresentar a primeira descrição de fetos partenogênicos bovinos recuperados aos 35-36 dias de gestação. Neste caso, o desenvolvimento pode ter sido beneficiado pela inovulação de 6 embriões ao mesmo tempo. No momento da coleta, observamos que os fetos partenogênicos ID possuíam tamanho reduzido, mas aparência normal tanto dos fetos quanto das membranas fetais. Há descrição de que genes maternos contribuem para o ectoderma primitivo (embrião propriamente dito) e paternos, para o trofoblasto (SOLTER, 1988). Assim, em camundongos, embriões partenogênicos apresentam falhas no desenvolvimento das membranas extra-embrionárias, enquanto androgenéticos possuem falhas na formação do embrião propriamente dito (CRUZ e PEDERSEN, 1991; KENDREW, 1994; KONO, 1998). Por outro lado, fetos ovinos partenogênicos recuperados aos 21 dias de gestação apresentam tamanho um pouco menor que o normal e semelhança em tamanho e

morfologia das membranas fetais (HAGEMANN et al., 1998; LOI et al., 1998). Dessa maneira, a ausência de alterações macroscópicas nos fetos partenogênicos ID indica que o comportamento da partenogênese em bovinos é semelhante a ovinos e diferente de camundongos. Isso pode ser devido ao tipo de placentação de cada espécie, visto que, em ruminantes, a placenta é cotiledonária, sinepiteliocorial e não-decídua enquanto que, em camundongos, é discoidal, hemocorial e decídua (LEISER e KAUFMANN, 1994).

Avaliação de genes “imprinted” em fetos partenogênicos

O comprometimento do desenvolvimento intra-uterino de embriões partenogênicos pode ser provocado pela ausência de genes “imprinted” expressos pelo alelo paterno (URANGA e ARECHAGA, 1997; VAN DE VELDE et al., 1999). Dessa maneira, os embriões parteno ou ginogenéticos e androgenéticos constituem modelo útil para estudo do “genomic imprinting”, visto que os primeiros são deficientes em transcritos que devem ser expressos pelo genoma paterno e o último, em expressos oriundos do genoma materno (WRENZYCKI et al., 2002).

Assim, neste trabalho, estudamos, em bovinos, os seguintes genes, conhecidamente “imprinted” em camundongos: *IGF2* e *XIST* (expressos paternos) e *IGF2r*, *MASH2* e *H19* (expressos maternos). O gene *IGF2* codifica o fator 2 semelhante à insulina (IGF-II), principal mitógeno embrionário e fetal (MOORE, 2001). O *XIST* participa na inativação do cromossomo X, um mecanismo de compensação da dosagem de genes ligados ao X entre machos (XY) e fêmeas (XX), cuja inativação, nos tecidos extra-embrionários, é preferencialmente paterna (WRENZYCKI et al., 2002). Dos genes de expressão materna, o *IGF2r* liga-se ao IGF-II e evita sua ligação ao receptor do tipo I, principal via de atividade, controlando, assim, sua disponibilidade (KENDREW, 1994). Assim, quanto maior a expressão de *IGF2r*, menor a quantidade de IGF-II livre e menor o tamanho do feto (KENDREW, 1994; SHI et al., 2003). O gene *MASH2* é expresso no trofoblasto e participa no desenvolvimento normal da placenta (ROSSANT et al., 1998) e o *H19* codifica uma molécula de RNA não traduzida (VERONA et al., 2003; ZHANG et al., 2004).

Em nosso experimento, comparamos os embriões partenogenéticos aos produzidos *in vitro* (FIV) a fim de isolar os efeitos da partenogênese dos efeitos do cultivo. Embora as membranas cório-alantóide do tratamento IS se apresentassem degeneradas, não houve variação na expressão dos genes estudados em comparação ao tratamento ID.

Dos genes de expressão paterna, nos partenogenéticos, observamos que houve redução de *IGF2* em fetos e membranas cório-alantóide, e aumento de *XIST* em cório-alantóide. Conseqüentemente, podemos afirmar que, na média, o gene *IGF2* comportou-se como “imprinted”, em bovinos, e essa menor expressão pode ter contribuído para a diminuição do tamanho dos fetos partenogenéticos como já havia sido descrito em ovinos (McLAREN e MONTGOMERY, 1999). Entretanto, pela análise isolada das amostras, percebemos que o feto ID2 apresentou expressão de *IGF2* semelhante aos três fetos FIV, indicando que o gene pode ter perdido o “imprint” e adquirido expressão materna nos tecidos fetais. Já foi demonstrado que a expressão de *IGF2* é bialélica no cérebro, em fetos ovinos (McLAREN e MONTGOMERY, 1999) e murinos (DINDOT et al., 2004) e que se torna bialélica no fígado, após o nascimento, em ovinos (McLAREN e MONTGOMERY, 1999). Entretanto, como para a extração de RNA, foi utilizado o feto inteiro, não podemos identificar se essa perda de “imprinting” foi generalizada ou restrita a alguns tecidos fetais como o cérebro. Para tanto, o ideal, em experimentos futuros, seria avaliar a expressão gênica, nos fetos, por hibridização *in situ*.

Em relação ao *XIST*, a expressão nos fetos partenogenéticos, na média, foi semelhante aos FIV, indicando que a inativação do cromossomo X, que é aleatória nos tecidos fetais, pode estar ocorrendo normalmente nos partenogenéticos. No entanto, a ausência de detecção de expressão no feto ID1 pode indicar falha generalizada na inativação do cromossomo X, mas isso só poderia ser confirmado por cariotipagem e observação da ausência do cromossomo X inativo de replicação tardia (WRENZYCKI et al., 2002). Nas membranas cório-alantóide, o *XIST* foi mais expresso nos partenogenéticos IS e ID que em FIV. Uma vez que, em bovinos, a expressão do *XIST* é preferencialmente paterna no cório, mas aleatória, no alantóide (DINDOT et al., 2004),

concluimos que, nos partenogénéticos, tanto pode ter havido perda desse “imprint” e ocorrência de expressão materna, quanto dificuldade de detecção do mesmo por utilização de amostras de cório e alantóide juntos. A perda de “imprint” do *XIST*, em partenogénéticos, já foi demonstrada pela identificação de cromossomo X inativo nos tecidos extra-embrionários (NESTEROVA et al., 2001). Por outro lado, precisamos considerar a possibilidade de que os fetos FIV1 e FIV2, que não expressaram *XIST*, sejam machos, nos quais o gene, geralmente é silencioso ou bem menos expresso (WRENZYCKI et al., 2002; DINDOT et al., 2004). Se considerarmos somente o feto FIV3, que expressou *XIST* e, provavelmente, trata-se de uma fêmea, observamos que os fetos partenogénéticos IS e ID, sabidamente fêmeas, expressaram quantidades semelhantes do gene.

Nos embriões partenogénéticos, a expectativa é de que os genes de expressão materna comportem-se de maneira semelhante aos fecundados *in vitro* ou que sejam mais expressos, no caso da expressão pelos dois alelos maternos devido à inexistência do “imprint” paterno. Para os genes *MASH2* e *H19*, a expressão, nos fetos e membranas cório-alantóide, em partenogénéticos, foi semelhante a FIV. Assim, como o *IGF2r* em cório-alantóide. Por outro lado, houve ausência de detecção da expressão do gene *IGF2r* no feto ID1. Isso pode ser devido a um mecanismo fisiológico compensatório adotado por esse feto para equilibrar a ausência de expressão de *IGF2*. Mecanismo semelhante já foi observado em embriões bovinos que apresentaram alterações de expressão gênica para compensar condições sub-ótimas de cultivo (NIEMANN et al., 2002) e superexpressão de genes para proteção contra efeitos deteriorantes (LAZZARI et al., 2002).

Variações individuais entre as amostras dos partenogénéticos ID foram detectadas para os genes *IGF2*, *IGF2r* e *XIST*, em fetos, e para o *MASH2*, em cório-alantóide, o que pode refletir um mecanismo de adaptação de cada embrião para aumentar suas chances de sobrevivência. Alterações no padrão esperado de expressão de genes “imprinted” já foram identificadas em embriões androgenéticos e podem ter sido provocadas pela extensa manipulação *in vitro* ou pela ausência do genoma materno, que atue como repressor (SASAKI et al., 1995; ADAM et al., 1996).

Os embriões partenogênicos e androgenéticos constituem importante recurso para a detecção de “imprints”. Entretanto, uma vez que o padrão de “imprint” pode ser modificado pelo cultivo, pela ausência do alelo repressor ou por um mecanismo de adaptação do embrião, a confirmação de genes “imprinted” deve ser feita por expressão alelo-específica, com base em polimorfismos em regiões codificadoras dos genes (DINDOT et al., 2004). A utilização de híbridos interespecíficos, como cruzamentos entre *Bos taurus* e *Bos gaurus*, pode aumentar a variação alélica, sem prejuízo à implantação, ao desenvolvimento fetal e ao nascimento, sendo ideal para o estudo de “imprinting” em bovinos (DINDOT et al., 2004). Acreditamos que o mesmo possa ser buscado nos cruzamentos entre *Bos taurus* e *Bos indicus*.

Estudos realizados em camundongos partenogênicos demonstraram que a manipulação do genoma, levando ao aumento do *IGF2* e à expressão monoalélica de *H19*, normalizou a expressão de 32 outros genes “imprinted” e possibilitou o nascimento (KONO et al., 2004). Em bovinos, ainda serão necessários estudos para verificar se os genes *H19* e *IGF2* são, realmente, os mais implicados nas falhas observadas em partenogênicos. Em nosso experimento, observamos que tanto a relação *IGF2/H19* quanto *IGF2/IGF2r*, em fetos e córion-alantóide, e *IGF2r/H19*, em fetos, foram afetadas nos partenogênicos. Desse modo, em bovinos, provavelmente, pelo menos mais o gene *IGF2r*, além do *IGF2* e do *H19*, terá que ser reorganizado para que o nascimento de um feto partenogênico ocorra.

Influência do cultivo: comparação entre fetos produzidos *in vivo* e *in vitro*

Para avaliar a influência do cultivo *in vitro* sobre a expressão de genes “imprinted”, comparamos os fetos produzidos *in vitro* (FIV) aos produzidos *in vivo* (TE). Maior expressão de *IGF2* já foi relatada em fetos FIV comparados a produzidos *in vivo*, aos 63 dias de gestação (NIEMANN et al., 2002). Em relação à média dos resultados, observamos aumento na expressão dos genes *IGF2* e *H19* e da relação *IGF2/IGF2r*, nas membranas córion-alantóide FIV comparadas às TE. Assim, tão importante quanto a expressão individual dos genes “imprinted”, pode ser a relação de equilíbrio entre eles.

Apesar de não detectarmos alterações de expressão gênica nos fetos, sabemos

que anormalidades placentárias, como as observadas na clonagem por transferência nuclear de célula somática (SCNT), são as principais causas de morte embrionária e fetal (JOUNEAU e RENARD, 2003). Assim, o cultivo *in vitro* afetou a expressão desses genes nas membranas fetais e pode comprometer o desenvolvimento dos fetos. A observação de alteração na expressão do *H19* confirma que esse pode ser um gene mais sensível às condições ambientais e à manipulação *in vitro* que outros genes "imprinted" (DOHERTY et al., 2000). Desse modo, talvez a expressão do *H19* possa ser utilizada, nos embriões FIV, como marcador da qualidade da produção *in vitro*.

Embriões bovinos produzidos *in vitro* e por SCNT apresentam maior variação individual na expressão gênica que os produzidos *in vivo* (CAMARGO et al., 2005). Em nosso trabalho, não observamos variação individual nas amostras de fetos FIV, mas sim, em cório-alantóide, para os genes *IGF2*, *IGF2r* e *MASH2*. Por outro lado, tanto amostras de feto quanto de cório-alantóide TE sofreram variação individual. Os fetos TE enfrentaram uma situação incomum aos bovinos: a ocorrência de gestações múltiplas, de 2 e 6 fetos, que pode ter gerado uma competição entre os fetos pelo aporte de nutrientes e levado à variação de expressão gênica entre eles.

Há informações de que 25-35% dos animais PIV (NIEMANN et al., 2002) e a maioria dos clonados apresentam distúrbios de desenvolvimento e crescimento, como a Síndrome do Bezerro Gigante (LOS), que é caracterizada por elevado peso ao nascimento, aumento do tempo de gestação, distocia, aborto, mortalidade périconal e desvios morfológicos (LAZZARI et al., 2002). Sabemos que o cultivo na presença de soro tem sido considerada a principal causa da LOS. No entanto, a utilização de BSA, como substituto ao soro, também provocou a Síndrome, que só foi evitada pelo PVA (LAZZARI et al., 2002). Acredita-se que essas alterações resultem do padrão anormal de expressão de genes importantes para o desenvolvimento. Vários genes podem ser responsabilizados, porém, as patologias encontradas nas diferentes espécies de clones produzidos foram semelhantes entre si (RIDEOUT et al., 2001) e parecidas com as provocadas por distúrbios, naturais ou experimentais, em genes "imprinted", em humanos (MOORE, 2001) e animais (YANG et al., 2005). Desse modo, os genes "imprinted", principalmente, *IGF2*, *IGF2r* e *H19*, têm sido considerados os principais

candidatos para a LOS (NIEMANN et al., 2002; RIZOS et al., 2002).

Uma vez que nosso objetivo foi avaliar a expressão gênica, não foram feitas mensurações morfológicas comparativas entre fetos TE e FIV para detectar a LOS a fim de evitar a degradação e a contaminação do RNA. Entretanto, após descongelação, observamos que a amostra 1 de feto produzido *in vitro* (FIV1) apresentou tamanho maior que o feto TE1. Dessa forma, quando comparamos especificamente o feto FIV1 ao TE1, observamos maior expressão de *IGF2*, que pode ter desencadeado o maior crescimento do feto FIV1. Esse aumento de tamanho, já observado aos 35-36 dias de gestação, indica que os sintomas da LOS podem ocorrer precocemente nos fetos acometidos. Relatos anteriores descreveram maior tamanho fetal, em bovinos produzidos *in vitro*, aos 63 dias de gestação (NIEMANN et al., 2002), mas não aos 51 dias (BERTOLINI e ANDERSON, 2002).

Desse modo, observamos que o gene *IGF2* comporta-se de maneira “imprinted”, em fetos bovinos e membranas cório-alantóide aos 35-36 dias de gestação. Entretanto, a expressão do *XIST*, detectada nos tecidos extra-embrionários, pode indicar perda do “imprint” desse gene. Sugerimos, pois, para o prosseguimento desses estudos, que a confirmação dessas informações seja feita por análises de expressão alelo-específica, hibridização *in situ*, cariotipagem e sexagem.

Uma vez que o cultivo *in vitro* na presença de soro fetal bovino, BSA e células da granulosa afetou a expressão dos genes *IGF2*, *H19* e da relação *IGF2/IGF2r*, acreditamos que ele possa comprometer o desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* e, portanto, a pesquisa para o estabelecimento de meios quimicamente definidos deve ser almejada. Sugerimos que a identificação da expressão desses genes, principalmente do *H19*, possa servir como marcador molecular em estudos de anormalidades do desenvolvimento associadas a biotecnologias da reprodução e para a determinação da eficiência de sistemas de cultivo *in vitro*.

Conclusões

Fetos e membranas fetais de partenotos bovinos, ativados por ionomicina e 6-DMAP, apresentaram desenvolvimento aparentemente normal até os 35 dias de gestação.

Fetos partenogenéticos bovinos apresentaram desenvolvimento reduzido e expressão “imprinted” do gene *IGF2*.

O “imprint” do gene *XIST* pode ter sido perdido nas membranas cório-alantóide de fetos partenogenéticos.

O cultivo *in vitro*, na presença de soro fetal bovino, BSA e células da granulosa, afetou a expressão dos genes *IGF2* e *H19* e a relação entre os genes *IGF2* e *IGF2r*.

CAPÍTULO 5 – IMPLICAÇÕES

A idéia dessa tese partiu das necessidades surgidas durante a evolução das pesquisas na área de Reprodução Animal em todo mundo e, em específico, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da FCAV-UNESP. O progresso do conhecimento, em algumas biotecnologias da reprodução, foi acompanhado pela observação de baixa eficiência e elevada ocorrência de anormalidades do desenvolvimento e crescimento. Dessa maneira, os estudos visaram à compreensão desses eventos e à sugestão de medidas a serem tomadas e de novas pesquisas a serem realizadas.

No capítulo 2, foi analisada a maturação *in vitro* (MIV), tanto nuclear quanto citoplasmática pela distribuição dos grânulos corticais, e observamos que a seleção morfológica dos oócitos antes da MIV não aumentou as taxas de maturação. Assim, acreditamos que para as condições utilizadas, atingimos o potencial de MIV: sem grande variação individual entre oócitos e sem limitação do desenvolvimento após realização das técnicas descritas nos capítulos 3 e 4. Entretanto, a busca por condições ideais (e não só não-limitantes) de maturação *in vitro* deve ser sempre almejada, uma vez que nessa fase há acúmulo de fatores imprescindíveis para a manutenção do embrião durante os estádios iniciais, diretamente responsáveis pelo seu desenvolvimento futuro.

Assim, sugerimos que, para avaliação da qualidade de maturação *in vitro* dos laboratórios em geral, além da convencional observação de maturação nuclear (tanto por coloração de cromatina quanto por visualização de extrusão do primeiro corpúsculo polar), sejam realizadas avaliações do estado de maturação citoplasmática, dentre as quais, a coloração de grânulos corticais, já bem estabelecida. Além disso, pesquisas futuras devem procurar por novas técnicas para a caracterização dos componentes moleculares (RNAm e proteínas) dos oócitos e para a compreensão de como esses fatores são afetados pela MIV.

Ainda no capítulo 2, acompanhamos a dinâmica nuclear após fecundação *in vitro*, com o objetivo principal de identificar o momento adequado de visualização e diferenciação dos pronúcleos masculino e feminino visando à aplicação da técnica de transferência pronuclear, no capítulo 3. Entretanto, o melhor momento determinado por coloração (14-18hpf; capítulo 2) não foi satisfatório para a visualização dos pronúcleos por centrifugação (capítulo 3), que também não permitiu a diferenciação dos mesmos pelo tamanho. Além disso, após centrifugação, os pronúcleos não foram visualizados em todos os zigotos e, possivelmente, naqueles em que houve formação de dois pronúcleos, nem sempre ambos foram evidentes, podendo levar a erros de ploidia após a realização da técnica. Uma vez que a coloração com Hoechst 33342 e a exposição à fluorescência podem prejudicar o desenvolvimento, é necessária a busca por alguma outra coloração vital, que não afete o embrião, mas que permita a visualização e a correta identificação dos pronúcleos. Em consequência, esse procedimento também favoreceria a transferência pronuclear, em embriões FIV, visto que após coloração, os pronúcleos poderiam ser visualizados mais precocemente e, assim, somente os embriões de desenvolvimento mais rápido, que possuem maior potencial de alcançarem o estágio de blastocisto, seriam selecionados e utilizados.

No capítulo 2, observamos que, provavelmente, o período de co-incubação entre espermatozóides e oócitos por 10h já foi suficiente para a FIV efetiva, de maneira a torná-la a fase da produção *in vitro* (PIV) com maior flexibilidade de horário (10-24h). Assim, a duração da FIV, baseada nas taxas de polispermia, formação de pronúcleos e desenvolvimento até blastocisto, deve ser estabelecida para cada laboratório de maneira a otimizar os horários de acordo com as necessidades individuais e de funcionamento de empresas comerciais.

Em experimentos prévios, buscamos avaliar a eficiência dos tratamentos de ativação por progressão nuclear e taxas de pronúcleo, clivagem e blastocisto. No entanto, essas técnicas não foram suficientes para esclarecer todos os eventos envolvidos na ativação artificial. Como, antes disso, o estrôncio não havia sido usado em bovinos e pouco se conhecia sobre seus efeitos, apesar de ser considerado mais fisiológico em camundongos, resolvemos compará-lo ao 6-DMAP, tratamento

amplamente utilizado em bovinos, que apresenta ótimos resultados de desenvolvimento, mas que pode promover algumas alterações, como a indução de mutagênese. Para tentar melhor compreender o efeito dos tratamentos de ativação, foi realizada a transferência pronuclear entre zigotos ativados e fecundados *in vitro* (capítulo 3). Entretanto, os resultados nos embriões FIV foram muito influenciados pela técnica e não puderam acrescentar nenhuma informação ao processo. Assim, novas tentativas, tais como a utilização de coloração vital, devem ser buscadas para o aperfeiçoamento da técnica e a realização eficiente da transferência pronuclear entre ativados e fecundados, de maneira a esclarecer o comportamento de citoplasma ativado sobre núcleo fecundado e vice-versa. Com esse objetivo e visando elucidar se o efeito dos tratamentos é mediado pelo núcleo, pelo citoplasma ou pelo carioplasma e fatores péri-nucleares, outra abordagem poderia ser realizada: a transferência de citoplasto, enriquecido ou não em frações citoplasmáticas específicas por centrifugação, entre embriões ativados e fecundados e entre ativados por tratamentos diferentes.

Observamos que, apesar do estrôncio se comportar de maneira mais semelhante à FIV quanto à dinâmica nuclear e de microtúbulos (MÉO, 2002), as taxas de bloqueio entre oito células e blastocisto foram maiores para o estrôncio que para o 6-DMAP, no capítulo 3. Assim, sugerimos novos experimentos para a investigação de eventos de apoptose e senescência nos embriões ativados por esses e por outros tratamentos. Além disso, uma vez que a principal aplicação dos tratamentos de ativação é em procedimentos de clonagem, os mesmos devem ser avaliados quanto ao efeito sobre as células somáticas transferidas, à expressão gênica resultante e ao desenvolvimento posterior dos embriões reconstituídos.

Os genes “imprinted” são genes candidatos à baixa eficiência e às anomalias do crescimento e desenvolvimento observadas em embriões PIV e clonados. Concluímos, por avaliação de fetos partenogenéticos, que o gene *IGF2* comportou-se como “imprinted”, em bovinos, mas que o *XIST*, provavelmente, perdeu essa marca nos tecidos extra-embrionários. Assim, essas amostras poderiam ser utilizadas, em novos experimentos, para o levantamento dos genes “imprinted” de expressão paterna em

bovinos. Vale ressaltar que a confirmação dessas informações deve ser feita por estudos de expressão alelo-específica, metilação, hibridização *in situ*, entre outros. Em especial aos genes ligados ao X e, no caso em estudo, ao *XIST*, seria indicado o acompanhamento da inativação do X nos tecidos, por cariotipagem, além da sexagem das amostras utilizadas. Além disso, uma vez que os “imprints” são estádio específicos, mais fases do desenvolvimento embrionário e fetal deveriam ser acompanhadas.

Observamos que o cultivo afetou a expressão, principalmente dos genes “imprinted” *IGF2*, *H19* e a relação *IGF2/IGF2r*. Dessa maneira, a avaliação da expressão desses genes poderia ser utilizada em procedimentos de rotina para determinação da eficiência de sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos. Além disso, para confirmar a relação entre a expressão gênica e os efeitos sobre o desenvolvimento, como a Síndrome do Bezerro Gigante, estudos morfológicos comparativos deveriam ser aliados à avaliação de expressão gênica.

Animais clonados que completam a gestação e nascem apresentam menos distúrbios de expressão gênica do que os que não progridem a termo. Além dessa informação, sabemos que, entre os diferentes clones, nem sempre os mesmos genes são afetados. Assim, além da investigação de genes alterados, devemos buscar descobrir as causas dessa expressão anômala com o intuito de encontrar soluções para corrigi-las e, conseqüentemente, aumentar o sucesso da transferência nuclear de célula somática.

Desse modo, muitos estudos ainda deverão ser realizados a fim de garantir a eficiência das biotécnicas da reprodução além da segurança e da reprodutibilidade desses procedimentos.

REFERÊNCIAS

ADAM, G. I. R.; CUI, H.; MILLER, S. J.; FLAM, F.; OHLSSON, R. Allele-specific in situ hybridization (ASISH) analysis: a novel technique which resolves differential allelic usage of *H19* within the same cell lineage during human placental development. **Development**, Cambridge, v. 122, p. 839-847, 1996.

ALBERIO, R.; BRERO, A.; MOTLÍK, J.; CREMER, T.; WOLF, E.; ZAKHARTCHENKO, V. Remodeling of donor nuclei, DNA-synthesis, and ploidy of bovine cumulus cell nuclear transfer embryos: effect of activation protocol. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 59, p. 371-379, 2001.

ALEXANDER, B.; COPPOLA, G.; DI BERARDINO, D.; RHO, G. J.; ST. JOHN, E.; BETTS, D. H.; KING, W. A. The effect of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) and cycloheximide (CHX) on the development and chromosomal complement of sheep parthenogenetic and nuclear transfer embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 73, p. 20-30, 2006.

ANCIOTO, K. L. **Maturação nuclear e padrões de proteínas em oócitos bovinos maturados na ausência e na presença de células do cumulus em meio suplementado com diversas fontes de macromoléculas**. 2004. 72 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

AVELINO, K. B. **Efeitos da estimulação e inibição da síntese de glutatona durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e a viabilidade embrionária**. 2004. 93 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

AVELINO, K. B. **Efeitos de fontes energéticas, antioxidantes e atmosfera gasosa, em meio quimicamente semi-definido no desenvolvimento de embriões bovinos de duas células até blastocisto expandido**. 2000. 70 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

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

BARTON, S. C.; SURANI, M. A. H.; NORRIS, M. L. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. **Nature**, London, v. 311, p. 374-376, 1984.

BERTOLINI, M.; ANDERSON, G. B. The placenta as a contributor to production of large calves. **Theriogenology**, Los Altos, v. 57, p. 181-187, 2002.

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

BOLS, P. E. J. **Transvaginal ovum pick-up in the cow: technical and biological modifications**. Merelbeke: Universiteit Gent, 1997. 228p.

BOS-MIKICH, A.; WHITTINGHAM, D. G.; JONES, K. T. Meiotic and mitotic Ca^{2+} oscillations affect cell composition in resulting blastocysts. **Dev. Biol.**, New York, v. 182, p. 172-179, 1997.

BUCK, A. **Produção de células tronco embrionárias (ES-Cells) murinas transfectadas com o cDNA do gene do hormônio do crescimento bovino (GH) mediante eletroporação e lipofecção**. 2003. 80 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

CAMARGO, L. S. de A.; POWELL, A. M.; VALE FILHO, V. R. do; WALL, R. J. Comparison of gene expression in individual preimplantation bovine embryos produced by *in vitro* fertilisation or somatic cell nuclear transfer. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v. 17, p. 487-496, 2005.

CHAN, A. W. S.; HOMAN, E. J.; BALLOU, L. U.; BURNS, J. C.; BREMEL, R. D. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 95, p. 14028-14033, 1998.

CHAN, A. W. S. Transgenic animals: current and alternative strategies. **Cloning**, Larchmont, v. 1, p. 25-46, 1999.

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

CHIAN, R. C.; SIRARD, M. A. Effects of cumulus cells and follicle-stimulating hormone during *in vitro* maturation on parthenogenetic activation of bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 42, p. 425-431, 1995.

CHUNG, J. T.; DOWNEY, B. R.; CASPER, R. F.; CHIAN, R. C. Effect of centrifugation on early embryonic development and parthenogenetic activation of bovine oocytes matured *in vitro*. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v. 13, p. 383-388, 2001.

CIVICO, S.; AGELL, N.; BACHS, O.; VANRELL, J. A.; BALASCH, J. Increased expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in cleavage-stage human embryos exhibiting developmental arrest. **Mol. Hum. Reprod.**, Oxford, v. 8, p. 919-922, 2002.

COELHO, L. de A. **Avaliação da viabilidade de embriões murinos produzidos *in vivo* e de embriões bovinos produzidos *in vitro* pela utilização do corante azul tripan.** 1997. 91 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

COHEN, J.; SCOTT, R.; SCHIMMEL, T.; LEVRON, J.; WILLADSEN, S. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. **Lancet**, London, v. 350, p. 186-187, 1997.

COLLAS, P. Cytoplasmic control of nuclear assembly. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v. 10, p. 581-592, 1998.

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

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

CRUZ, Y. P.; PEDERSEN, R. A. Origin of embryonic and extraembryonic cell lineages in mammalian embryos. In: **Animal application of research in mammalian development.** Cold Spring: Harbor Laboratory Press, 1991. p. 147-204.

CUTHBERTSON, K. S. R.; WHITTINGHAM, D. G.; COBBOLD, P. H. Free Ca^{2+} increases in exponential phase during mouse oocyte activation. **Nature**, London, v. 294, p. 754-757, 1981.

DEAN, W.; BOWDEN, L.; AITCHISON, A.; KLOSE, J.; MOORE, T.; MENESES, J. J.; REIK, W.; FEIL, R. Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. **Development**, Cambridge, v. 125, p. 2273-2282, 1998.

DIAS, V. S. **Influência do suplemento de macromoléculas e da atmosfera gasosa na maturação oocitária e competência no desenvolvimento embrionário bovino.** 2003. 83 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

DINDOT, S. V.; KENT, K. C.; EVERS, B.; LOSKUTOFF, N.; WOMACK, J.; PIEDRAHITA, J. A. Conservation of genomic imprinting at the *XIST*, *IGF2*, and *GTL2* loci in the bovine. **Mamm. Genome**, New York, v. 15, p. 966-974, 2004.

DOHERTY, A. S.; MANN, M. R. W.; TREMBLAY, K. D.; BARTOLOMEI, M. S.; SCHULTZ, R. M. Differential effects of culture on imprinted *H19* expression in the preimplantation mouse embryo. **Biol. Reprod.**, New York, v. 62, p. 1526-1535, 2000.

DUCIBELLA, T.; ANDERSON, E.; ALBERTINI, D. F.; AALBERG, J.; RANGARAJAN, S. Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. **Dev. Biol.**, New York, v. 130, p. 184-197, 1988.

FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 55, p. 151-170, 2001.

FAVETTA, L. A.; ROBERT, C.; St. JOHN, E. J.; BETTS, D. H.; KING, W. A. p66^{shc}, but not p53, is involved in early arrest of *in vitro*-produced bovine embryos. **Mol. Hum. Reprod.**, Oxford, v. 10, p. 383-392, 2004.

FEIL, R.; KHOSLA, S.; CAPPAL, P.; LOI, P. Genomic imprinting in ruminants: allele-specific gene expression in parthenogenetic sheep. **Mamm. Genome**, New York, v. 9, p. 831-834, 1998.

FERREIRA, C. R. **Produção de embriões bovinos com mtDNA heterólogo de *B. t. indicus* e *B. t. taurus* e estudo da segregação mitocondrial durante a pré-implantação**. 2002. 93 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

FUKUI, Y.; SAWAI, K.; FURUDATE, M.; SATO, N.; IWAZUMI, Y.; OHSAKI, K. Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin B after in vitro maturation. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 33, p. 357-362, 1992.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, Los Altos, v. 59, p. 599-616, 2003.

GARCIA, J. M.; LIMA, V. F. H.; PINHEIRO, L. E. L.; MIKICH, A. B. Estudos com maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios quimicamente definidos. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 4, p. 69-75, 1988.

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

GOSDEN, R.; TRASLER, J.; LUCIFERO, D.; FADDY, M. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. **Lancet**, London, v. 361, p. 1975-1977, 2003.

HAGEMANN, L. J.; PETERSON, A. J.; WEILERT, L. L.; LEE, R. S. F.; TERVIT, H. R. In vitro and early in vivo development of sheep gynogenones and putative androgenones. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 50, p. 154-162, 1998.

HALL, V. J.; RUDDOCK, N. T.; FRENCH, A. J. Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine in vivo, in vitro, and nuclear transfer blastocysts. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 72, p. 16-24, 2005.

HAMILTON, H. M.; PEURA, T. T.; LAURINCIK, J.; WALKER, S. K.; MADDOCKS, S.; MADDOX-HYTTEL, P. Ovine ooplasm directs initial nucleolar assembly in embryos cloned from ovine, bovine, and porcine cells. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 69, p. 117-125, 2004.

HAN, Z.; CHUNG, Y. G.; GAO, S.; LATHAM, K. E. Maternal factors controlling blastomere fragmentation in early mouse embryos. **Biol. Reprod.**, New York, v. 72, p. 612-618, 2005.

HE, C. L.; DAMIANI, P.; PARYS, J. B.; FISSORE, R. A. Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, New York, v. 57, p. 1245-1255, 1997.

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

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v. 59, p. 675-685, 2003.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in classified bovine oocyte. **Theriogenology**, Los Altos, v. 45, p. 274, 1996 (resumo).

HUMPHERYS, D.; EGGAN, K.; AKUTSU, H.; HOCHEDLINGER, K.; RIDEOUT, W. M. III; BINISZKIEWICZ, D.; YANAGIMACHI, R.; JAENISCH, R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. **Science**, Washington, v. 293, p. 95-97, 2001.

INOUE, K.; KOHDA, T.; LEE, J.; OGONUKI, N.; MOCHIDA, K.; NOGUCHI, Y.; TANEMURA, K.; KANEKO-ISHINO, T.; ISHINO, F.; OGURA, A. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. **Science**, Washington, v. 295, p. 297, 2002.

JAENISCH, R. DNA methylation and imprinting: why bother? **Trends Genet.**, Amsterdam, v. 13, p. 323-329, 1997.

JOUNEAU, A.; RENARD, J.-P. Reprogramming in nuclear transfer. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, London, v. 13, p. 486-491, 2003.

KATOH, M.; ARAKI, A.; OGURA, T.; VALDIVIA, R. P. A. 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), which is used to produce most cloned animals, is mutagenic in *Salmonella typhimurium* TA1535. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 560, p. 199-201, 2004.

KENDREW, J. **The encyclopedia of molecular biology**. Oxford: Blackwell Science, 1994. p. 790-794.

KIM, K. S.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. Follicular cells affect the fertilizability and developmental competency for bovine oocytes *in vitro*. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v. 9, p.763-766, 1997.

KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. M.; HERRMANN, D.; van der WEIJDEN, G. C.; NIEMANN, H.; DIELEMAN, S. J. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. **Reproduction**, Cambridge, v. 124, p. 365-375, 2002.

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

KONO, T.; OBATA, Y.; WU, Q.; NIWA, K.; ONO, Y.; YAMAMOTO, Y.; PARK, E. S.; SEO, J.-S.; OGAWA, H. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. **Nature**, London, v. 428, p. 860-864, 2004.

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

LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; DUCHI, R.; GALLI, C. Developmental potential of bovine androgenetic and parthenogenetic embryos: a comparative study. **Biol. Reprod.**, New York, v. 70, p. 400-405, 2004.

LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biol. Reprod.**, New York, v. 67, p. 767-775, 2002.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Exp. Clin. Endocrinol.**, Leipzig, v. 102, p. 122-134, 1994.

LIM, J. M.; LEE, B. C.; LEE, E. S.; CHUNG, H. M.; KO, J. J.; PARK, S. E.; CHA, K. Y.; HWANG, W. S. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein-free medium: effects of carbohydrates and amino acids. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v. 11, p. 127-132, 1999.

LIU, H.; KREY, L. C.; ZHANG, J.; GRITO, J. A. Ooplasmic influence on nuclear fragmentation during the Metaphase II-Interphase transition in mouse oocytes. **Biol. Reprod.**, New York, v. 65, p. 1794-1799, 2001.

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

LOI, P.; LEDDA, S.; FULKA Jr., J.; CAPPAL, P.; MOOR, R. M. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. **Biol. Reprod.**, New York, v. 58, p. 1177-1187, 1998.

LO TURCO, E. G. **Maturação nuclear e padrões de apoptose em oócitos bovinos na presença de células do cumulus em meio suplementado com diversas fontes de macromoléculas**. 2004. 78 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

MADDOX-HYTTEL, P.; HUNTER, R. H.; VAJTA, G.; CALLESEN, H. Ultrastructure and actin distribution after fractionation of bovine oocytes for somatic cell nuclear transfer. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. v. 2, p. 560.

MAEDA, J.; KOTSUJI, F.; NEGAMI, A.; KAMITANI, N; TOMINAGA, T. In vitro development of bovine embryos in conditioned media from bovine granulosa cells and Vero cells cultured in exogenous protein- and amino acid-free chemically defined human tubal fluid medium. **Biol. Reprod.**, New York, v. 54, p. 930-936, 1996.

MANN, M. R. W.; BARTOLOMEI, M. S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. **Genome Biol.**, London, v. 3, p. 1003.1-1003.4, 2002.

MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine. **Theriogenology**, Los Altos, v. 49, p. 3-11, 1998.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. **Cell**, Cambridge, v. 37, p. 179-183, 1984a.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygote to support development in vitro. **Science**, Washington, v. 226, p. 1317-1319, 1984b.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Nucleocytoplasmic interactions in the mouse embryo. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, Cambridge, v. 97, p. 277-289 (Suppl.), 1986.

McLAREN, R. J.; MONTGOMERY, G. W. Genomic imprinting of the insulin-like growth factor 2 gene in sheep. **Mamm. Genome**, New York, v. 10, p. 588-591, 1999.

MEIJER, L.; PONDAVEN, P. Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. **Exp. Cell Res.**, New York, v. 174, p. 116-129, 1988.

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

MEIRELLES, F. V.; SMITH, L. C. Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. **Genetics**, Austin, v. 145, p. 445-451, 1997.

MÉO, S. C. **Ativação, clivagem e desenvolvimento inicial de oócitos bovinos por etanol, estrôncio e eletrochoque como ativadores únicos e combinados**. 1999. 68 f. Trabalho (Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

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

MÉO, S. C.; YAMAZAKI, W.; LEAL, C. L. V.; OLIVEIRA, J. A. de; GARCIA, J. M. Use of strontium for bovine oocyte activation. **Theriogenology**, Los Altos, v. 63, p. 2089-2102, 2005.

MIKICH, A. B.; PINHEIRO, L. E. L.; AZOUBEL, R.; GARCIA, J. M. Oogenesis and follicle development in fetal cross-breed Zebu cattle. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 2, p. 211-216, 1986.

MINGOTI, G. Z. **Esteroidogênese por células da granulosa em co-cultivo com oócitos bovinos: efeito de esteróides na maturação (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV)**. 1995. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1995.

MINGOTI, G. Z. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese: papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides**. 2000. 141 f. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MOORE, T. Genetic conflict, genomic imprinting and establishment of the epigenotype in relation to growth. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, p. 185-193, 2001.

MOORE, T.; REIK, W. Genetic conflict in early development: parental imprinting in normal and abnormal growth. **Rev. Reprod.**, Colchester, v. 1, p. 73-77, 1996.

NAGASHIMA, H.; ASHMAN, R. J.; NOTTLE, M. B. Nuclear transfer of porcine embryos using cryopreserved delipated blastomeres as donor nuclei. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 48, p. 339-343, 1997.

NAKADA, K.; MIZUNO, J. Intracellular calcium responses in bovine oocytes induced by spermatozoa and by reagents. **Theriogenology**, Los Altos, v. 50, p. 269-282, 1998.

NAVARA, C. S.; FIRST, N. L.; SCHATTEN, G. Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis, and nuclear transfer: the role of the sperm aster. **Dev. Biol.**, New York, v. 162, p. 29-40, 1994.

NESTEROVA, T. B.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A.; BROCKDORFF, N. Loss of *Xist* imprinting in diploid parthenogenetic preimplantation embryos. **Dev. Biol.**, New York, v. 235, p. 343-350, 2001.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; BRAMBRINK, T.; KUES, W. A.; CARNWATH, J. W. Gene expression patterns in bovine *in vitro*-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. **Cloning Stem Cells**, Larchmont, v. 4, p. 29-38, 2002.

NUSSBAUM, D. J.; PRATHER, R. S. Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 41, p. 70-75, 1995.

OKAMOTO, I.; TAN, S. -S.; TAKAGI, N. X-chromosome inactivation in XX androgenetic mouse embryos surviving implantation. **Development**, Cambridge, v. 127, p. 4137-4145, 2000.

PEURA, T. T.; TROUNSON, A. O. Recycling bovine embryos for nuclear transfer. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v. 10, p. 627-632, 1998.

QUETGLAS, M. D. **Efeitos dos fatores de crescimento insulin-like growth factors I e II (IGF-I, IGF-II) na maturação *in vitro* de oócitos *Bos indicus* e subsequente produção de embriões *in vitro*.** 1997. 83 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

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

RICHARD, F. J.; SIRARD, M. -A. Effects of follicular cells on oocyte maturation II: theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. **Biol. Reprod.**, New York, v. 54, p. 22-28, 1996.

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

RIVERA, R. M.; DAHLGREN, G. M.; CASTRO E PAULA, L. A. de; KENNEDY, R. T.; HANSEN, P. J. Actions of thermal stress in two-cell bovine embryos: oxygen metabolism, glutathione and ATP content, and the time-course of development. **Reproduction**, Cambridge, v. 128, p. 33-42, 2004.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; ARROYO-GARCÍA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biol. Reprod.**, New York, v. 66, p. 589-595, 2002.

ROSSANT, J.; GUILLEMOT, F.; TANAKA, M.; LATHAM, K.; GERTENSTEIN, M.; NAGY, A. *Mash2* is expressed in oogenesis and preimplantation development but is not required for blastocyst formation. **Mech. Dev.**, Shannon, v. 73, p. 183-191, 1998.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (eds) **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p. 365-386. Disponível no site <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.

RUVINSKY, A. Basics of gametic imprinting. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v. 77 (Suppl.2)/ **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v. 82 (Suppl.2), p. 228-237, 1999.

RYCKE, M. De.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies. **Hum. Reprod.**, Oxford, v. 17, p. 2487-2494, 2002.

SAACKE, R. G.; DALTON, J. C.; NADIR, S.; NEBEL, R. L.; BAME, J. H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 60-61, p. 663-677, 2000.

SAEKI, R.; KATO, H.; HOSOI, Y.; MIYAKE, M.; UTSUMI, K.; IRITANI, A. Early morphological events of in vitro fertilized bovine oocytes with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, Los Altos, v. 35, p. 1051-1059, 1991.

SASAKI, H.; FERGUSON-SMITH, A. C.; SHUM, A. S. W.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A. Temporal and spatial regulation of *H19* imprinting in normal and uniparental mouse embryos. **Development**, Cambridge, v. 121, p. 4195-4202, 1995.

SCOTT, L.; WHITTINGHAM, D. G. Role of facilitative glucose uptake in the glucose-inorganic phosphate-mediated retardation and inhibition of development in different strains of mouse embryos. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, p. 691-700, 2002.

SHI, W.; ZAKHARTCHENKO, W.; WOLF, E. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. **Differentiation**, London, v. 71, p. 91-113, 2003.

SOLTER, D. Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 22, p. 127-146, 1988.

SORIA, G. F. **Embriões bovinos desenvolvidos em sistemas de cultivo quimicamente definidos ou suplementados com fontes protéicas**. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

SURANI, M. A. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. **Nature**, London, v. 414, p. 122-128, 2001.

SUSKO-PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; NORTHEY, D. L. SCHUTZKUS, V.; FIRST, N. L. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transitional of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. **Dev. Biol.**, New York, v. 166, p. 729-739, 1994.

SWALES, A. K. E.; SPEARS, N. Genomic imprinting and reproduction. **Reproduction**, Cambridge, v. 130, p. 389-399, 2005.

TATHAM, B. G.; SATHANANTHAN, A. H.; DHARMAWARDENA, V.; MUSESINGHE, D. Y.; LEWIS, I.; TROUNSON, A. O. Centrifugation of bovine oocytes for nuclear micromanipulation and sperm microinjection. **Hum. Reprod.**, Oxford, v. 11, p. 1499-1503, 1996.

THOMPSON, S. L.; KONFORTOVA, G.; GREGORY, R. I.; REIK, W.; DEAN, W.; FEIL, R. Environmental effects on genomic imprinting in mammals. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v. 120, p. 143-150, 2001.

- URANGA, J. A.; ARECHAGA, J. Cell proliferation is reduced in parthenogenetic mouse embryos at the blastocyst stage: a quantitative study. **Anat. Rec.**, New York, v. 247, p. 243-247, 1997.
- VAN DE VELDE, A.; LIU, L.; BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. -T.; YANG, X. Cell allocation and chromosomal complement of parthenogenetic and IVF bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 54, p. 57-62, 1999.
- VERLHAC, M. -H.; KUBIAK, J. Z.; CLARKE, H. J.; MARO, B. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity by not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. **Development**, Cambridge, v. 120, p. 1017-1025, 1994.
- VERONA, R. I.; MANN, M. R. W.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic imprinting: intricacies of epigenetic regulation in clusters. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, Palo Alto, v. 19, p. 237-259, 2003.
- VITULLO, A. D.; OZIL, J. -P. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. **Dev. Biol.**, New York, v. 151, p. 128-136, 1992.
- WALL, R. J.; HAWK, H. W. Development of centrifuged cow zygotes cultured in rabbit oviducts. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 82, p. 673-680, 1988.
- WALL, R. J. Pronuclear microinjection. **Cloning Stem Cells**, Larchmont, v. 3, p. 209-220, 2001.
- WATANABE, Y. F. **Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos após maturação e fecundação *in vitro* com sêmen de *Bos taurus* e *Bos indicus***. 1993. 131 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1993.
- WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. 2^a. ed., New York: Scientific American Books, 1992. p. 267-272.
- WESTHUSIN, M. E., De AZAMBUJA, R. M. Development of in vitro derived bovine embryos following pronuclear transplantation and in vitro culture. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 45, p. 29-35, 1996.
- WHITE, K. L.; YUE, C. Intracellular receptors and agents that induce activation in bovine oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 45, p. 91-100, 1996.
- WOLF, A. **Estímulo da síntese de glutatona na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário**. 2005. 101 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

- WOLF, A. **Obtenção, manutenção e caracterização de linhas celulares semelhantes às células tronco embrionárias (ES-like-cells) de bovino**. 2000. 110 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.
- WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; HERRMANN, D.; LEMME, E.; KORSWE, K.; NIEMANN, H. In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. **Biol. Reprod.**, New York, v. 66, p. 127-134, 2002.
- WRENZYCKI, C.; WELLS, D.; HERRMANN, D.; MILLER, A.; OLIVER, J.; TERVIT, R.; NIEMANN, H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. **Biol. Reprod.**, New York, v. 65, p. 309-317, 2001.
- YAMAZAKI, W. **Clonagem em bovinos utilizando-se células somáticas de animais adultos: avaliação comparativa da reconstituição de citoplastos pelas técnicas de transferência nuclear e injeção nuclear intracitoplasmática**. 2001. 132 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.
- YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C. R.; MÉO, S. C.; LEAL, C. L. V.; MEIRELLES, F. V.; GARCIA, J. M. Use of strontium in the activation of bovine oocytes reconstructed by somatic cell nuclear transfer. **Zygote**, Cambridge, v. 13, p. 295-302, 2005.
- YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C. R.; MÉO, S. C.; MEIRELLES, F. V.; GARCIA, J. M. Clonagem e a bezerra "Penta": primeiro clone produzido no Brasil a partir de células de um animal adulto. **O Embrião**, Jaboticabal, n. 12, p. 3-5, jul./ago./set. 2002.
- YANG, L.; CHAVATTE-PALMER, P.; KUBOTA, C.; O'NEILL, M.; HOAGLAND, T.; RENARD, J.-P.; TANEJA, M.; YANG, X.; TIAN, X.C. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 71, p. 431-438, 2005.
- YANG, X.; PRESICCE, G. A.; MORAGHAN, L.; JIANG, S.; FOOTE, R. H. Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 41, p. 395-403, 1994.
- YASEEN, M. A.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different *in vitro* systems. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, p. 601-610, 2001.
- YOUNG, L. E.; FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, Los Altos, v. 53, p. 627-648, 2000.

YOUNG, L. E.; FERNANDES, K.; McEVOY, T. G.; BUTTERWITH, S. C.; GUTIERREZ, C. G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P. J.; ROBINSON, J. J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K. D. Epigenetic change in *IGF2R* is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nat. Genet.**, New York, v. 27, p. 153-154, 2001.

ZHANG, S.; KUBOTA, C.; YANG, L.; ZHANG, Y.; PAGE, R.; O'NEILL, M.; YANG, X.; TIAN, X. C. Genomic imprinting of H19 in naturally reproduced and cloned cattle. **Biol. Reprod.**, New York, v. 71, p. 1540-1544, 2004.