

TATÍCIA LIEH IKEDA

***ANORMALIDADES FETAIS E PLACENTÁRIAS
DECORRENTES DA PRODUÇÃO IN VITRO DE
EMBRIÕES BOVINOS***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP
para obtenção do grau de médico veterinário

Preceptor: *Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes*

Botucatu
2009

TATÍCIA LIEH IKEDA

***ANORMALIDADES FETAIS E PLACENTÁRIAS
DECORRENTES DA PRODUÇÃO IN VITRO DE
EMBRIÕES BOVINOS***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de médico veterinário

Área de Concentração: Reprodução Animal

Preceptor: *Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes*

Coordenador de Estágios: *Prof. Dr. Francisco José Teixeira Neto*

Botucatu
2009

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP

Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Ikeda, Tatícia Lieh.

Anormalidades fetais e placentárias decorrentes da produção *in vitro* de embriões bovinos/ Tatícia Lieh Ikeda. – 2009.

Monografia (bacharelado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009

1. Reprodução animal.

Palavras-chave: Produção *in vitro*; Embrião bovino; Síndrome da Cria Grande; Placenta

IKEDA, TATÍCIA LIEH. Anormalidades fetais e placentárias decorrentes da produção *in vitro* de embriões bovinos. Botucatu, 2009. 21p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV) tornou-se uma das biotecnias da reprodução de maior expressão no Brasil, sendo considerada uma importante ferramenta para o melhoramento genético do rebanho nacional. Entretanto, diversas alterações são associadas a PIV, incluindo altas taxas de perdas embrionárias e fetais, maior incidência de hidroalantóide e distocias, tempo de gestação prolongado, maior peso ao nascer de bezerros e alta mortalidade perinatal. O conjunto dessas patologias é denominado Síndrome da Cria Grande e é considerado um fator limitante para o emprego da PIV em larga escala na pecuária.

Palavras-chave: Produção *in vitro*; embrião bovino, Síndrome da Cria Grande; placenta

IKEDA, TATÍCIA LIEH. Fetal and placental abnormalities due to *in vitro*-production of bovine embryos. Botucatu, 2009. 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

In vitro production of bovine embryo (IVP) has become a remarkable assisted reproduction biotechnology in Brazil, once it is considered an important tool for the genetic improvement of the herd. However, many abnormalities are associated with IVP technologies, such as higher incidences of embryo loss, abortions, hydrallantois and dystocia, prolonged gestation, increased birth weight and high perinatal mortality. Collectively, these abnormalities are known as “Large Offspring Syndrome”, which has limited the large-scale use of IVP technologies in cattle industry.

Keywords: In vitro production; bovine embryo; Large Offspring Syndrome; placenta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	5
REVISÃO DA LITERATURA.....	6
1. ANORMALIDADES ASSOCIADAS A <i>PIV</i>	6
1.1. Perdas Gestacionais	7
1.2. Anormalidades Fetais e Placentárias	8
2. POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA <i>LOS</i>	12
CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

INTRODUÇÃO

Desde a década de 80, tem se intensificado a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV), destacando-se pelas suas aplicações comerciais e científicas. É considerada uma ferramenta para o melhoramento genético de um rebanho e para impedir o descarte precoce de fêmeas com alto valor genético. Além disso, a PIV permite ampliar os conhecimentos fisiológicos envolvidos na maturação de oócitos, na fecundação e no desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação.

O Brasil é um dos países mais ativos nas tecnologias relacionadas com embriões, sendo o segundo país na produção total de embriões por MOET e o primeiro na produção de embriões por OPU/PIV (PONTES *et al.*, 2009). De acordo com dados publicados pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões, em 2005, quase 50% das transferências de embriões bovinos provenientes do sistema *in vitro* foram realizadas por países da América do Sul, sendo que a maior atividade é vista no Brasil.

Apesar da popularidade da PIV no Brasil, ainda existem limitações para sua efetiva aplicação na pecuária (PONTES *et al.*, 2009). Os embriões produzidos *in vitro* são considerados inferiores em qualidade quando comparados com aqueles produzidos *in vivo* (LONERGAN & FAIR, 2008), apresentando alterações morfológicas, metabólicas, no tempo de desenvolvimento, na criotolerância e na expressão gênica (LAZZARI *et al.*, 2002).

Após a implantação da transferência de embriões produzidos *in vitro*, foi observado um número considerável de nascimentos em bovinos. Embora a maioria dos bezerros nascidos aparentava ser normal, algumas alterações foram relatadas, destacando-se a alta incidência de perdas embrionárias, abortos e hidroalantóide, gestação prolongada, aumento no peso ao nascer, distocias e alta mortalidade perinatal. Essas alterações fazem parte do fenômeno conhecido como Síndrome da Cria Grande (revisito por JACOBSEN *et al.*, 2000).

REVISÃO DE LITERATURA

1 ANORMALIDADES ASSOCIADAS A PIV

A PIV possui um grande potencial para o emprego mais amplo em diversos sistemas de gado de corte ou de leite. Entretanto, uma consequência negativa desse tipo de produção de embriões, tanto em bovinos como em outras espécies, é o fato de que fetos, placentas e prole podem significativamente diferir daqueles derivados dos sistemas *in vivo*, morfológicamente e na capacidade de se desenvolver (FARIN *et al.*, 2006). Desde o início da década de 90, foi observado que embriões bovinos expostos aos meios *in vitro* resultavam em nascimentos de animais de tamanho incomum, além de apresentar diversas anormalidades em órgãos (YOUNG *et al.*, 1998; BERTOLINI & ANDERSON, 2002). Essas alterações fenotípicas são consideradas parte da Síndrome da Cria Grande (LOS – *Large Offspring Syndrome*; FARIN *et al.*, 2006). A LOS foi primeiramente associada com a transferência nuclear de células somáticas, porém já foi observada em embriões derivados da PIV, em transferências não sincronizadas de embriões e no tratamento da fêmea com progesterona logo após a ovulação (WALKER *et al.*, 1996) e com dietas ricas em uréia (YOUNG *et al.*, 1998).

A LOS é caracterizada por diversas patologias, como peso ao nascer elevado e aumento na duração da gestação, sendo estas as alterações mais frequentes (LAZZARI *et al.* 2002). Além disso, pode-se observar elevada incidência de aborto, distocias e morte perinatal (LAZZARI *et al.* 2002), desenvolvimento anormal de órgãos (FARIN *et al.*, 2006), baixa taxa de prenhez, deformidades musculoesqueléticas, hidroalantóide e outros defeitos placentários (FARIN *et al.*, 2004). A incidência da LOS é frequentemente associada com o emprego de soro e do co-cultivo durante as etapas da PIV (LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Como uma população, a distribuição do peso corporal de fetos e neonatos derivados da PIV possui um deslocamento para direita na curva normal de peso ao nascer (revisto por FARIN *et al.*, 2006), ou seja, o peso médio desses fetos está acima do limite máximo do peso considerado normal (BERTOLINI &

ANDERSON, 2002). Considerando que as alterações no desenvolvimento ocorrem em apenas uma parte dos fetos derivados do sistema *in vitro*, pode-se concluir que aqueles animais que não são considerados “grandes” apresentam-se normais quanto seus desenvolvimentos. Entretanto, mesmo os animais com peso ao nascer normal podem apresentar alterações em diversos órgãos, como coração, cérebro e medula espinhal e musculatura esquelética (FARIN *et al.*, 2006). Dessa forma, Farin *et al.* (2006) propuseram a mudança do termo LOS para Síndrome da Cria Anormal (AOS – *Abnormal Offspring Syndrome*) por melhor descrever as alterações observadas em fetos e placentas derivadas da PIV. A diversidade de fenótipos e o nascimento de bezerros normais tornam difícil a identificação das causas da LOS (YOUNG *et al.*, 1998).

1.1 Perdas Gestacionais

Em bovinos, a incidência de perda gestacional é maior durante o período embrionário, ou seja, entre o primeiro e 42º dia de prenhez, quando comparada com os períodos fetal e neonatal. Em embriões produzidos *in vitro*, as taxas de perdas embrionária, fetal e perinatal são maiores que as observadas em programas de inseminação artificial e transferência de embriões produzidos *in vivo* (LONERGAN *et al.*, 2007). Grande parte das perdas gestacionais é observada antes do dia 21 de prenhez ou duas semanas após inovulação, indicando falha na sinalização para o reconhecimento materno. O adequado desenvolvimento embrionário é necessário para que ocorra o reconhecimento materno e posterior desenvolvimento correto fetal e placentário (FARIN *et al.*, 2006). Ademais, foi observado que níveis elevados de uréia no plasma materno e de amônia no meio de cultivo *in vitro* contribuem para a baixa sobrevivência embrionária e alterado desenvolvimento dos fetos que sobrevivem (FARIN *et al.*, 2001).

A taxa de abortamento é maior no sistema *in vitro* em relação ao *in vivo*. Perdas significativas são observadas principalmente durante os primeiros estádios de desenvolvimento fetal e placentário (30 a 90 dias de gestação; FARIN *et al.*, 2006). Agca *et al.* (1998) observou 13% de perda fetal após o quadragésimo dia de gestação, enquanto que a incidência de abortamento em receptoras de embriões

produzidos *in vivo* não é maior que 5% (revisto por FARIN *et al.*, 2006). A alta taxa de perda fetal pode ser resultado do desenvolvimento anormal da placenta (FARIN *et al.*, 2001), podendo estar associado ao número reduzido de placentomas e ao desenvolvimento vascular alterado desta (MILES, 2004).

Em programas da PIV, a prevalência de natimortos e de morte neonatal varia de 2,4% a 15,6% em novilhas e 17,9% em vacas (revisto por FARIN *et al.*, 2006). A morte perinatal é atribuída, em parte, como consequência das distocias associadas ao tamanho elevado dos fetos. Além disso, o aumento da duração da gestação, o desenvolvimento insuficiente e inadequado funcionamento da placenta e as falhas nos mecanismos metabólicos necessários para a vida extra-uterina são considerados problemas que diminuem a viabilidade dos neonatos (FARIN *et al.*, 2006).

1.2 Anormalidades Fetais e Placentárias

Freqüentemente, é relatado por produtores que animais derivados da PIV não apresentam o vigor esperado e tendem a ser maiores, letárgicos e predispostos a morrer inexplicavelmente (MCEVOY *et al.*, 2006). Os neonatos geralmente apresentam-se fracos, com dificuldades respiratórias e relutância em mamar (YOUNG *et al.*, 1998), sendo mais susceptíveis a infecções neonatais. Garry *et al.* (1996), em pesquisas realizadas com clones bovinos, sugeriu que o metabolismo energético alterado poderia estar associado com a fraqueza e a morte neonatal observadas. Nesse estudo, foi demonstrado nível plasmático alterado de insulina e glucagon, o que poderia alterar a suplementação e utilização energética na vida intra-uterina, promovendo o crescimento fetal e predispondo o neonato à dificuldade de se adaptar a vida extra-uterina. Fenômeno similar é observado em bebês humanos com diabetes gestacional, porém, na LOS, o problema é intrínseco ao feto e dificilmente pode estar associado a problemas com a fêmea (YOUNG *et al.*, 1998).

A saúde de bezerras pode também ser comprometida por defeitos congênitos como hipoplasia cerebelar, problemas respiratórios e insuficiência cardíaca (revisto por FARIN *et al.*, 2006). Schnidt *et al.* (1996) observou que 38% das

mortes de bezerros derivados da PIV foram por hipoplasia cerebelar, enterite e pneumonia, demonstrando alta susceptibilidade a infecções e podendo estar associada com a presença de imunodeficiência congênita. Nesse estudo, a taxa de mortalidade foi de 9%, sendo esta a mesma para mortalidade de bezerros *in vivo*. Outras anormalidades também foram descritas, entre elas aumento na massa muscular e alterações na composição da fibra muscular e mal-formações esqueléticas e faciais. Essas alterações demonstram que não apenas o crescimento é alterado, mas o desenvolvimento de órgãos nobres também é perturbado (YOUNG *et al.*, 1998).

Uma das hipóteses sobre a causa de nascimento de cria fraca seja a disfunção materno-fetal (YOUNG *et al.*, 1998), pois pode conduzir ao estresse fetal, devido a distúrbios na troca gasosa e de nutrientes (FARIN *et al.*, 2001). A capacidade da placenta de suprir as necessidades energéticas do feto parece ser influenciada pela PIV (KRUIP *et al.*, 1997). As primeiras caracterizações de bezerros produzidos *in vitro* descrevem alterações morfológicas e funcionais da placenta (BERTOLINI & ANDERSON, 2002), sendo estas freqüentemente associadas com a perda embrionária e o crescimento anormal do feto (LANDIM-ALVARENGA, 2006). Diferenças na unidade materno-fetal também podem ser causas das diferenças encontradas no tempo de gestação (MILES, 2004). O grau de alteração placentária é variável e nem sempre resulta em perda fetal (LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Durante a organogênese, o favorecimento da distribuição celular para a trofotoderme observada em embriões produzidos *in vitro* pode alterar o tamanho e funções da placenta. Como conseqüência, há o desenvolvimento de placentas maiores que o normal, o que pode influenciar o crescimento e desenvolvimento fetal. Além disso, embriões que apresentam massa celular interna menor que o normal podem não conseguir passar o primeiro trimestre de prenhez (WALKER *et al.*, 1996).

Em estudo realizado por Bertolini *et al.* (2002), analisando o tamanho fetal e as características placentárias no decorrer da gestação, foi observado que fetos derivados da PIV eram menores em tamanho que o grupo controle produzido *in*

vivo, no início da gestação. Porém, no final da gestação, este quadro invertia-se. Resultados semelhantes foram observados por outros autores, relatando nenhuma diferença de tamanho entre fetos produzidos *in vitro* e *in vivo* no dia 70 de gestação, mas, no dia 222 de gestação, os fetos do grupo *in vitro* eram mais pesados que o grupo controle. O crescimento bifásico observado por Bertolini *et al.* (2002) era caracterizado pelo retardamento no crescimento fetal na primeira fase de gestação seguido de desenvolvimento anormal da placenta. Dessa forma, o peso ao nascer elevado dos neonatos pode ser consequência de alterações na placenta que impossibilitaria esta de restringir o crescimento fetal no final da gestação. Foi também sugerido que o retardamento no crescimento primário fetal e as perdas fetais podem ser em parte resultado de angiogênese deficiente e desenvolvimento anormal do alantóide durante a placentação.

No final da gestação, tanto placentas como fetos derivados da PIV apresentam-se mais pesados que o normal, além de possuir menor área de contato materno-fetal (FARIN *et al.*, 2001). Placentas originadas da PIV podem exibir menor número de placentomas (MILES, 2004), porém, nestes casos, podem se apresentar maiores indicando mecanismos de compensação para a insuficiência placentária no primeiro trimestre de gestação (BUCZINSKI *et al.*, 2007). A diminuição no número de cotilédones, com epitélio coriônico normal, também foi observada, podendo causar subnutrição e morte fetal por defeitos na troca materno-fetal (LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Anormalidades em placenta como hidropsia das membranas fetais são largamente descritas (YOUNG *et al.*, 1998), sendo que a incidência de hidroalantóide é significativamente maior em gestações da PIV (0,5%) em relação às gestações derivadas do sistema *in vivo* (0,01%; DROST, 2007). O desenvolvimento anormal do alantóide pode conduzir à falha da angiogênese na placentação no dia 35 de gestação (THOMPSON *et al.*, 2002). Alguns autores associam a presença de hidroalantóide com insuficiência renal de fetos. Porém acredita-se que o hidralantóide é relacionado com alterações na placentação, enquanto que as anormalidades congênicas do feto resultariam em hidroâmnio (BERTOLINI *et al.*, 2002; BUCZINSKI *et al.*, 2007). Outras más-formações do

alantóide também foram descritas, como atrofia e alantóide avascular (BUCZINSKI *et al.*, 2007).

Microscopicamente, foi demonstrado que a população de células binucleadas difere entre placentas *in vitro* e *in vivo*. No início da gestação, a densidade dessas células é maior em placentomas de embriões *in vitro*, porém, com o decorrer da gestação, esse volume tende a diminuir (FARIN *et al.*, 2000). As células binucleadas são responsáveis pela produção de hormônios e produtos bioativos importantes na regulação do crescimento e desenvolvimento fetal (BERTOLINI *et al.*, 2002).

Durante a gestação, a unidade feto-placentária é capaz de estabelecer mecanismos compensatórios em casos de anormalidades menores, como leve aumento do tamanho fetal e pequenas diferenças dos parâmetros bioquímicos. Observa-se, em alguns casos, aumento do volume sanguíneo dos vasos presentes nas carúnculas e da densidade de vasos sanguíneos na superfície dos placentomas. A concentração de glicose e frutose é aumentada no plasma e fluidos fetais, bem como na superfície placentária (revisado por FARIN *et al.*, 2006). Em vacas clonadas, foi observada a presença de cotilédones gigantes, indicando mecanismos compensatórios para a placentação deficiente no início da gestação (LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Porém, em casos de alterações severas, como hidroalantóide, subdesenvolvimento pulmonar e cardíaco e diminuição da área dos placentomas, feto e placenta não são capazes de compensar adequadamente essas alterações, resultando no nascimento de animais com parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos alterados. Esses animais irão precisar de cuidados intensivos e normalmente morrem perto do momento do parto ou durante o período neonatal (FARIN *et al.*, 2006).

2 POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA LOS

Um fator evidente que contribui para algumas das conseqüências observadas na PIV é o período que oócitos e embriões permanecem no sistema *in vitro* (MCEVOY *et al.*, 2006), no qual os meios utilizados e a manipulação podem alterar a fisiologia das células de embriões e oócitos por induzir o estresse celular. As respostas conseqüentes ao estresse modificam dramaticamente os padrões de expressão gênica através de alterações nos mecanismos epigenéticos ou na regulação da transcrição gênica (THOMPSON *et al.*, 2002).

A expressão gênica tem um papel fundamental na coordenação de mecanismos metabólicos dos organismos vivos. O controle preciso da expressão gênica durante o desenvolvimento na fase pré-implantação é particularmente essencial, pois diversos eventos importantes ocorrem nesse período, como clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação da mórula e formação do blastocisto. Dessa forma a fase de pré-implantação representa um período susceptível para programação anormal dos genes. Embora embriões são extremamente capazes de se adaptar a condições adversas da PIV, a sensibilidade deles ao ambiente pode conduzir a alterações com conseqüências a longo termo (LONERGAN *et al.*, 2006).

Foi inicialmente proposto que os mecanismos envolvidos na LOS baseiam-se na alteração de padrões epigenéticos de embriões na fase de pré-implantação, resultando na expressão alterada de genes *imprinted* importantes para a regulação do desenvolvimento e crescimento adequado de fetos e placentas (FARIN *et al.* 2004, 2006). A avaliação dos padrões de expressão gênica em embriões, fetos e placentas de diversas espécies produzidos *in vitro* demonstrou a expressão alterada de genes *imprinted*, genes ligados ao X e genes não-*imprinted* (FARIN *et al.*, 2006).

A modificação epigenética permite que a transcrição dos genes seja alterada mantendo a seqüência primária do DNA. O *imprinting* genômico é considerado um processo da epigenética, no qual ocorre a expressão gênica de apenas um dos alelos parentais (SWALES & SPEARS, 2005). A falha no processo de *imprinting* pode resultar na super-expressão bi-alélica ou na falta de

expressão gênica (MOORE *et al.*, 2007). Um dos elementos básicos do mecanismo do *imprinting* é a metilação do DNA, sendo esta controlada por enzimas DNA-metiltransferase (DNMT; SWALES & SPEARS, 2005). O possível envolvimento da programação epigenética na patofisiologia da LOS é evidenciado por duas fases críticas desta: durante o crescimento oocitário e a fase de pré-implantação embrionária (THOMPSON *et al.*, 2007).

As células germinativas são liberadas dos padrões epigenéticos através da desmetilação do DNA, sendo que estes são restabelecidos durante a espermatogênese e oogênese (FARIN *et al.*, 2004). Durante o desenvolvimento do oócito, os níveis de metilação do DNA aumentam tanto para o estabelecimento adequado dos padrões de *imprinting* materno, como para a metilação de seqüências de genes não-*imprinted* (SWALES & SPEARS, 2005). A partir da fertilização, ocorre o processo de desmetilação *de novo* dos genes não-*imprinted*, permanecendo protegidos os genes *imprinted* contra a desmetilação, tanto nos genes paternos quanto maternos (FARIN *et al.* 2004; SWALES & SPEARS, 2005). Em bovinos, esse processo persiste até o estágio de blastocisto (FARIN *et al.* 2004).

Esses eventos críticos da modificação epigenética ocorrem exatamente quando os embriões estão expostos a um ambiente artificial durante os procedimentos *in vitro*. Dessa forma, acredita-se que o meio de cultivo *in vitro* resulta em alterações na expressão de diversos genes *imprinted* (FARIN *et al.*, 2004). Foi observado que grande parte desses estão envolvidos com o crescimento e desenvolvimento de fetos e placentas de mamíferos (SWALES & SPEARS, 2005). A alteração de padrões epigenéticos tem sido associada com a expressão anormal de genes *imprinted* durante os desenvolvimentos embrionários, fetais e placentários (FARIN *et al.*, 2004), podendo levar a alterações na proliferação e diferenciação de linhagens celulares, bem como na comunicação feto-placentária e nas interações materno-fetais (MOORE *et al.*, 2007).

As mudanças fisiológicas associadas com a LOS podem, em parte, ser resultados de aberrações na atividade da DNMT-1, enzima responsável pela manutenção dos padrões de metilação de genes *imprinted* durante a replicação do

DNA (FARIN *et al.*, 2004). Além disso, alterações na atividade das enzimas DNMT-3a e -3b, responsáveis pelo armazenamento de novos padrões de metilação (SWALES & SPEARS, 2005), durante a fase de remetilação, podem afetar grandes porções do genoma, sendo também associada a LOS (FARIN *et al.*, 2004). Outros possíveis fatores envolvidos nessa síndrome são a estrutura da cromatina e a modificação de histonas, influenciando a disponibilidade do genoma para a ação das DNMTs e transcrição de fatores e RNA-polimerases (FARIN *et al.*, 2004).

Foi demonstrada que a exposição de embriões ao meio de cultivo *in vitro* altera diversos genes *imprinted*, entre eles o gene H19 e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF; SHAH *et al.*, 2007), sendo que ambos estão ligados com o crescimento celular. A perda de genes *imprinted* como o IGF-II com subsequente aumento da expressão de IGF-II pode ser um possível fator para a ocorrência da LOS (JACOBSEN *et al.* 2000). O aumento nas concentrações de IGF-I e IGF-II na circulação maternal e alterações em proteínas ligadas ao IGF presentes no líquido amniótico e alantóide podem estar relacionadas com o crescimento anormal de fetos (BERTOLINI & ANDERSON, 2002).

Estudos sobre a LOS na espécie ovina identificaram mudanças no nível de expressão do gene IGF-IIR devido alterações epigenéticas (SWALES & SPEARS, 2005). Young *et al.* (2001) encontraram níveis de metilação e expressão do gene IGF-IIR reduzidos de 30-60% no plasma, fígado e musculatura de fetos ovinos no dia 125 de gestação (LAZZARI *et al.*, 2002). Em bovinos, Blondin *et al.* (2000) observaram o aumento nos níveis de mRNA de IGF-II em fetos derivados do sistema *in vitro* no dia 63 de gestação (LAZZARI *et al.*, 2002), sendo que a expressão desse fator estava aumentada no fígado e diminuída na musculatura esquelética no dia 70 de gestação (BERTOLINI & ANDERSON, 2002).

A família dos IGF desempenha um importante e crítico papel na regulação do crescimento e desenvolvimento embrionário, fetal e placentário. Qualquer falha na expressão gênica normal destes fatores poderia ter um grande impacto sobre a viabilidade fetal. A expressão de IGF-II favorece o crescimento fetal (SWALES & SPEARS, 2005). Recentemente foi demonstrado que o IGF-IIR

sofre *imprinting* em bovinos, sendo considerado um regulador negativo de crescimento de células somáticas. Os IGF-I e IGF-IR são, por sua vez, genes não-*imprinted* e estão envolvidos com a apoptose celular. Embora a expressão aumentada do gene IGF-II sozinho pode não ter impacto sobre o crescimento fetal, na ausência de IGF-IIR, o elevado nível de IGF-II pode resultar em aumento de crescimento fetal e placentário severo (revisto por MOORE *et al.*, 2007).

O cultivo *in vitro* é a etapa da PIV mais associada com alterações no desenvolvimento fetal, pois se sabe que o tipo de meio utilizado na fase de pós-fertilização tem grande impacto na qualidade dos blastocistos e na expressão gênica destes. Há poucos dados referentes ao papel da maturação *in vitro* no desenvolvimento fetal após a transferência (FARIN *et al.*, 2004). Os efeitos da maturação oocitária *in vitro* no desenvolvimento subsequente de embriões e fetos ainda não foram elucidados. Sabe-se que oócitos maturados *in vitro* apresentam diferenças na capacidade de desenvolvimento dos complexos *cumulus*-oócitos quando comparados com oócitos maturados *in vivo*. (FARIN *et al.*, 2006). Dois estudos demonstram seu possível envolvimento com a LOS. Holm *et al.* (1996) observou que o peso ao nascer de cordeiros era maior no grupo maturado e fertilizado *in vitro*, seguido por cultivo *in vivo*, em relação ao grupo controle (FARIN *et al.*, 2004). Foi observado também por Behboodi *et al.* (2001) que animais transgênicos derivados de oócitos maturados *in vitro* tiveram peso ao nascer maior que aqueles derivados de oócitos maturados *in vivo*. Entretanto, quando se analisou a expressão de seis tipos de mRNA em blastocistos bovinos produzidos inteiramente pelo sistema *in vitro*, não se observou diferenças com os blastocistos derivados de oócitos maturados *in vivo*, mas fertilizados e cultivados *in vitro*. Dessa forma, ainda não se sabe se a maturação *in vitro* pode afetar o estabelecimento final de padrões de metilação em oócitos bovinos, podendo alterar o desenvolvimento subsequente de embriões e fetos (revisto por FARIN *et al.*, 2006).

Outro possível mecanismo responsável por diferenças encontradas entre fetos derivados de sistemas *in vitro* e *in vivo* é o desenvolvimento alterado da placenta de animais advindos da PIV. Bertolini *et al.* (2002) demonstraram que

alterações morfológicas e funcionais de placentomas podem conduzir ao excesso de fornecimento de substratos ao feto. Efeitos diretos sobre o feto não podem ser descartados, considerando que existem evidências que a placenta é responsável, em parte, pelo alterado crescimento fetal. Além disso, sabe-se que genes *imprinted* possuem grande influência durante desenvolvimento placentário (revisado por FARIN *et al.*, 2004). Dessa forma, a perda de *imprints* apropriados poderia resultar em alterações na transcrição e tradução de diversos genes, causando funcionamento anormal da placenta (MOORE *et al.*, 2007) e afetando indiretamente o desenvolvimento do feto, independente da presença de alguma alteração no *imprinting* fetal (THOMPSON *et al.*, 2002).

A expressão alterada de genes que normalmente não são submetidos ao processo de *imprinting* demonstra que não apenas aberrações na expressão de genes *imprinted* estão envolvidas na patofisiologia da LOS (FARIN *et al.*, 2004). Diversos papéis importantes são desempenhados por genes não-*imprinted* na compactação e cavitação de embriões, reconhecimento materno, crescimento e metabolismo de fetos, desenvolvimento muscular, diferenciação do trofoblasto e implantação. Por exemplo, foi demonstrado que blastocistos *in vitro* apresentam expressão aumentada de mRNA para transportador de glicose (GLUT), proteína de choque térmico (Hsp) 70.1, fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), e IGF-IR (LAZZARI *et al.*, 2002). Pode-se sugerir que a alteração nos padrões de metilação influencia a regulação de genes não-*imprinted*, provocando conseqüências fisiológicas secundárias às mudanças na expressão de genes *imprinted* durante a gestação (FARIN *et al.*, 2004).

CONCLUSÃO

A PIV é uma ferramenta atrativa tanto para fins científicos como comerciais. Através dessa biotecnologia é possível intensificar e diminuir o custo da produção de embriões e acelerar a produção de animais geneticamente superiores, além de aprofundar o entendimento de aspectos endócrinos, metabólicos e moleculares envolvidos no desenvolvimento embrionário. Entretanto, diversos problemas associados com a manipulação *in vitro* tornam difícil seu emprego em larga escala na pecuária. É observado que a PIV resulta em embriões de menor qualidade, menor taxa de prenhez e prole exibindo desenvolvimento alterado, entre outros.

A LOS é composta por diversas anormalidades em fetos e placentas, sendo associada principalmente a PIV e a transferência nuclear de células somáticas. Os mecanismos envolvidos nessa síndrome ainda não foram elucidados. Acredita-se que a exposição de embriões a meios inadequados provoque o estresse celular e acarrete modificações gênicas envolvendo alterações nos padrões epigenéticos e de transcrição gênica. A identificação dos genes envolvidos no mecanismo da LOS é um obstáculo essencial a ser transposto. Torna-se necessário o completo entendimento da relação entre fenótipo alterado, anormalidades nos padrões epigenéticos e alterações na expressão de RNAm e proteínas (FARIN *et al.*, 2006). Entretanto, a variação de resultados obtidos entre os laboratórios de PIV e entre rotinas realizadas por um mesmo laboratório dificulta descobrir quais genes são responsáveis pelo o desenvolvimento anormal de fetos e placentas.

A identificação dos mecanismos exatos envolvidos na LOS é de grande importância para que a PIV torne-se uma ferramenta mais aplicável. Através da identificação dos genes associados a LOS, será possível avaliar os diferentes tipos de meios empregados durante a PIV sobre o desenvolvimento embrionário e, conseqüentemente, sobre as características da prole. Dessa forma, será possível definir um protocolo eficaz de PIV, no qual as diferenças morfológicas e fisiológicas em relação aos embriões derivados do sistema *in vivo* serão mínimas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTOLINI, M. et al. Morphology and morphometry of in vivo and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. **Theriogenology**, v. 58, p.973-994, 2002.

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

BUCZINSKI, S.M.C. et al. Fetal well-being assessment in bovine near-term gestations: Current knowledge and future perspectives arising from comparative medicine. **Can Vet J**, v. 48, p.178–183, 2007.

DROST, M. Complications during gestation in the cow. **Theriogenology**, v.68, p.487–491, 2007.

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

FARIN, C.E.; FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A. Development of fetuses from in vitro–produced and cloned bovine embryos. **J Anim Sci**, v.82, p.53-62, 2004.

FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A; FARIN, C.E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.65, p.178–191, 2006.

JACOBSEN, H. et al. Body dimensions and birth and organ weights of calves derived from in vitro produced embryos cultered with or without serum and oviduct epithelium cells. **Theriogenology**, v.53, p.1761-1769, 2000.

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

LANDIM-ALVARENGA, F.C. Patologias da Gestação. In: PRESTES, N.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. **Obstetrícia Veterinária**. 1ª Edição. Rio de Janeiro. E.Guanabara Koogan. 2006. Capítulo 10, p. 132-133.

LAZZARI, G. et al. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**, v.67, p.767–775, 2002.

LONERGAN, P. et al. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v.65, p.137–152, 2006.

LONERGAN, P. et al. Pregnancy and fetal characteristics after transfer of vitrified in vivo and cloned bovine embryos. **Theriogenology**, v.68, p.1128–1137, 2007.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos—Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17–22, 2008.

MCEVOY, T.G. et al. Embryo technologies and animal health – consequences for the animal following ovum pick-up, in vitro embryo production and somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, v.65, p.926–942, 2006.

MILES, J.R. Effects of embryo production systems on angiogenesis and development of bovine placentas. 2004. 196f. Dissertação (doutorado) – Universidade do Estado de Carolina do Norte, Raleigh.

MOORE, K. et al. Insulin-like growth factor (IGF) family genes are aberrantly expressed in bovine conceptuses produced in vitro or by nuclear transfer.

Theriogenology, v.68, p.717–727, 2007.

PONTES, J.H.F et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows.

Theriogenology, v.71, p.690–697, 2009.

SHAH, K.D. et al. Estrone sulfate and progesterone profiles during late gestation in recipient cows transferred embryos produced by nuclear transfer and in vitro fertilization. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, n.6, p.1237-1246, 2007.

SCHMIDT, M. et al. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.46, p.527-539, 1996.

SWALES, A.K.; SPEARS, N. Genomic imprinting and reproduction. **Society for Reproduction and Fertility**, v.130, p. 389–399, 2005.

THOMPSON, J.G. et al. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: Short- and long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: more reason for caution?.

Human Reproduction, v.17, n.11, p.2783–2786, 2002.

THOMPSON, J.G. et al. Embryo culture and long-term consequences.

Reproduction, Fertility and Development, v.19, p.43–52, 2007.

WALKER, S.K.; HARTWICH, K.M.; SEAMARK, R.F. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. **Theriogenology**, v.45, p.111-120, 1996

YOUNG, L.E. et al. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v.3, p.155–163, 1998.