

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CONTRIBUIÇÃO PARA A CLONAGEM EM  
EQÜINOS POR MEIO DE TRANSFERÊNCIA  
NUCLEAR

**CLAUDIA BARBOSA FERNANDES**

Botucatu – SP  
Fevereiro 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CONTRIBUIÇÃO PARA A CLONAGEM EM  
EQÜINOS POR MEIO DE TRANSFERÊNCIA  
NUCLEAR

**CLAUDIA BARBOSA FERNANDES**

**Tese apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Medicina Veterinária para  
obtenção do título de Doutor.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda  
da Cruz Landim e Alvarenga

Botucatu – SP  
Fevereiro 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Fernandes, Claudia Barbosa.

Contribuição para a clonagem em eqüinos por meio de transferência nuclear  
/ Claudia Barbosa Fernandes. – Botucatu [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Assunto CAPES: 50504002

1. Eqüino - Reprodução

CDD 636.20824

Palavras-chave: Ativação artificial; Clonagem; Enucleação química; Eqüinos;  
Tranferência nuclear

***Dedico este trabalho de tese aos meus pais,  
Wania e Claudio, pelo exemplo de humildade, amor,  
educação e incentivo que me permitiram a realização  
de mais um ideal e ao meu marido Alexandre pelo  
carinho, paciência e colaboração constantes.***

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por tudo;

A minha orientadora, amiga e “chefa” querida, **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga**, pelos muitos ensinamentos, oportunidades, apoio e confiança sem os quais não seria possível a realização deste trabalho;

Aos professores **Marco Antônio Alvarenga, Nereu Carlos Prestes, Maria Denise Lopes, Frederico Ozanan Papa, Sony Dimas Bicudo, Eunice Oba, João Carlos Pinheiro Ferreira e Cezinande Meira** pelo apoio, amizade e interesse que tornaram tão agradável a convivência no departamento durante estes seis anos;

Ao professor **José Antônio Visintin** e sua orientada **Heloísa** pelo incentivo e pelos conhecimentos de cultivo celular, etapa fundamental para o desenvolvimento deste projeto;

Ao professor **Joaquim Mansano Garcia** e seus orientados **Christina Ramires, Felipe Perecin e Naiara Saraiva** pela paciência em responder todas as dúvidas em micromanipulação e enucleação química;

Aos professores **Marcelo Marcondes Seneda e Maria Isabel Martins** e ao **Paulão** - técnico do laboratório de reprodução animal da Universidade Estadual de Londrina - por propiciarem a limpeza e manipulação dos ovários de matadouro;

Aos professores **Luis Losinno e Marcelo Miragaya** e as suas colaboradoras **Carolina Herrera e Mariana Révora** que mesmo de longe (Argentina), sempre torceram e colaboraram para com o resultado desta pesquisa;

À professora **Katrin Hinrichs** e ao doutor **Young Ho Choi** por terem nos recebido em seu laboratório (Texas – EUA) e esclarecido nossas dúvidas em relação à transferência nuclear em eqüinos;

Aos amigos e companheiros de trabalho **Patrícia, João, Luciana Leal, Lílian, Ieda, Liani, Daniela, Camila, Tatiana, Catalina, Amanda, Renata, Cely, Ana Isabel, Ian, Carla, Ana Augusta, Jeane, Giovana, Viviane, Marina, Cássia, Márcio, Heder, Eduardo, José Dellaqua** e **Antônio Silvio** pelo companheirismo e grande ajuda durante toda a realização deste experimento que não tinha hora para acontecer;

Aos residentes **Maria Clara, Rosiara, Carmo** e **Gabriel** por serem sempre tão queridos e prestativos;

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal **Cristina, Márcio, Valter, Tico, Miguel, Edilson, Marquinho, D. Raquel** e **D. Cida**, à **Denise, Maria** e **Zé Roberto** do setor de Pós-Graduação, e aos funcionários do Setor de **Transporte** da FMVZ-UNESP Botucatu, que sempre estiveram dispostos a ajudar quando eu mais precisei;

Ao **Frigorífico Santa Fé – Santa Fé/PR**, e aos médicos veterinários **Gércio Bonesi, Eduardo Yabushita** e **Melissa Campos** por terem contribuído na colheita dos ovários durante todo o experimento;

Ao professor **Hélio R. C. Nunes**, e ao amigo **Gustavo H. M. Araújo** que gentilmente elaboraram as análises estatísticas;

A bibliotecária, **Selma Maria de Jesus**, que elaborou a ficha catalográfica;

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho (Processo. nº 04/00822-1);

A todas as pessoas que, apesar de não mencionadas, contribuíram com este trabalho.

## LISTA DE ABREVIações

BME: “Basal medium eagle”

BSA\*: Albumina sérica bovina

Ca<sup>2+</sup>: Cálcio

CCO: Complexo *cumulus* ovócito

CP: Corpúsculo polar

CSF\*: Fator citostático

6 DMAP: 6-Dimetilaminopurina

DMEM: “Dubecco’s modified eagle medium”

DMEM/F12: “Dubecco’s modified eagle medium/nutrient mixture F-12”

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA\*: Ácido desoxirribonucléico

DTT: Dithiothreitol

EGF\*: Fator de crescimento epidermal

eGH\*: Hormônio de crescimento eqüino

FSH\*: Hormônio folículo estimulante

FSHe\*: Hormônio folículo estimulante eqüino

HTF: “Human tubal fluid”

ICSI\*: Injeção intracitoplasmática de gametas

IGF-I\*: Fator de crescimento semelhante a insulina I

IP3: Inositol trifosfato

LH\*: Hormônio luteinizante

M I: Metáfase I

M II: Metáfase II

MAPK\*: Proteína quinase ativada por mitógeno

MCI: Massa celular interna

MEM: “Minimun essencial medium”

Mos\*: Produto do proto-oncogene c-mos

MPF\*: Fator promotor de maturação

PBS: “Phosphate buffer saline”

PIV: Produção *in vitro*

QVG: Quebra da vesícula germinativa

RNAm\*: Ácido ribonucleico mensageiro

SFB: Soro fetal bovino

TCM 199: “Tissue culture media 199”

TN: Transferência nuclear

TVA\*: Aspiração folicular transvaginal

UV: Luz ultravioleta

VG: Vesícula germinativa

---

\*Algumas abreviaturas foram mantidas como na língua inglesa pela consagração do uso.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Índice de integridade e lesão de membrana pós-descongelamento de fibroblastos eqüinos doadores de núcleo para a transferência nuclear em dois protocolos de sincronização do ciclo celular.....48
- Tabela 2 - Índice de sincronização do ciclo celular (G0/G1) pós-descongelamento de fibroblastos eqüinos doadores de núcleo para a transferência nuclear em dois protocolos de sincronização do ciclo celular.....49
- Tabela 3 - Ajuste do modelo logístico que explica o percentual de ovócitos com formação de protusão do material nuclear no espaço perivitelínico, em relação à dose de demecolcina.....58
- Tabela 4 - Comparações entre espécies em relação ao percentual de protusão da placa metafásica de ovócitos submetidos ao tratamento com demecolcina nas concentrações de 0,05µg/ml (bovina) e 0,2µg/ml (eqüina) após 19 e 30 horas de maturação *in vitro* respectivamente.....59
- Tabela 5 - Percentual de descondensação da cromatina obtida às 24 horas a partir da ativação partenogenética de ovócitos bovinos utilizando-se quatro protocolos de ativação artificial e duas concentrações de cálcio no meio de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; E: estrôncio; 6 D: 6 DMAP).....62
- Tabela 6 - Percentual de descondensação da cromatina obtida às 24 horas de cultivo, após a ativação partenogenética de ovócitos eqüinos utilizando-se três protocolos de ativação artificial e duas concentrações de cálcio (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; 6 D: 6 DMAP).....64
- Tabela 7 - Percentual de clivagens obtidas aos três dias após a ativação partenogenética de ovócitos eqüinos utilizando-se três protocolos de ativação artificial e duas concentrações de cálcio no meio de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; 6 D: 6 DMAP).....67

Tabela 8 – Porcentagem de formação de núcleo descondensado no terceiro dia de cultivo após a transferência nuclear para ovócitos eqüinos, levando em consideração a classificação do ovócito em compacto e expandido, o grau de maturação nuclear em metáfase I e II, o protocolo de ativação artificial com o uso de Ionomicina associada ao roscovitine ou ao 6 DMAP e também se houve ou não a prévia exposição ao roscovitine antes da maturação *in vitro* (I: ionomicina; R: roscovitine; 6 D: DMAP).....72

Tabela 9 - Análise de *Deviance* e comparação entre ajustes de modelos de regressão logística para explicar o percentual de ovócitos com formação de núcleo descondensado no terceiro dia de cultivo após a transferência nuclear.....73

Tabela 10 - Ajuste do modelo logístico para explicar o percentual de ovócitos com formação de núcleo descondensado no terceiro dia de cultivo em função do estágio de maturação no momento da transferência nuclear.....73

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (A) Colheita de tecido de pele eqüino para cultivo de fibroblastos; (B) fragmento de pele coletado.....27
- Figura 2 - Garrafas com fragmentos de pele em crescimento celular na estufa 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar.....27
- Figura 3 - Aspecto morfológico do cultivo primário de fibroblastos eqüinos em confluência (microscópio invertido com contraste de fase pH 1, aumento de 200x).....27
- Figura 4 - Células em azul (viáveis) e células em vermelho (membrana lesada) (microscópio invertido, aumento de 400x).....30
- Figura 5 - A a E – Seqüência de colheita de ovócitos eqüinos por meio de curetagem individual e lavagem de folículos com 10 a 30 mm de diâmetro.....32
- Figura 6 - Aspecto de um ovócito grau I proveniente de ovário de matadouro e selecionado para a maturação *in vitro* (microscópio esteroscópico, aumento de 40x).....33
- Figura 7 - A e B – Aspecto dos ovócitos classificados como expandidos e selecionados para a maturação *in vitro* (microscópio esteroscópico, aumento de 40x).....33
- Figura 8 - A e B – Aspecto dos ovócitos classificados como compactos e selecionados para a maturação *in vitro* (microscópio esteroscópico, aumento de 40x e 80x para as figuras A e B respectivamente)....33
- Figura 9 - Distribuição dos ovócitos eqüinos nos grupos experimentais de avaliação do estágio de maturação nuclear.....34

- Figura 10 - Ovócito eqüino em Metáfase II após 30 horas de maturação *in vitro*. (seta: corpúsculo polar) (microscópio invertido, aumento de 400x).....36
- Figura 11 - Distribuição dos ovócitos bovinos nos grupos experimentais de ativação partenogenética para 24 horas de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; E: estrôncio; 6D: 6 DMAP).....40
- Figura 12 - Distribuição dos ovócitos eqüinos nos grupos experimentais de ativação partenogenética em 24 horas de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; 6D: 6 DMAP).....42
- Figura 13 - Distribuição dos ovócitos eqüinos nos grupos experimentais de ativação partenogenética em três dias de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; 6D: 6 DMAP).....42
- Figura 14 -Figura ilustrativa demonstrando a montagem das gotas de micromanipulação.....44
- Figura 15 - (A) Preparação do micromanipulador para os procedimentos de enucleação; (B) – Placa de micromanipulação.....44
- Figura 16 - (A) Enucleação ovocitária com a retirada do corpúsculo polar do espaço perivitelínico e da placa metafásica junto ao ovolema (seta); (B) o material nuclear das duas estruturas e dispensado na gota (seta); (C) o fibroblasto é colocado próximo ao bisel da agulha (seta); (D) injeção do fibroblasto (seta) (microscópio invertido, aumento de 400x).....45
- Figura 17 - Distribuição dos ovócitos eqüinos nos grupos experimentais de ativação artificial após TN (I: ionomicina; R: roscovitine; 6D: 6 DMAP).....46
- Figura 18 -Estágio de maturação nuclear de CCO eqüinos compactos e expandidos após a colheita (Teste exato de Fisher,  $p= 0,851$ ).....51

- Figura 19 -Estágio de maturação nuclear de CCO eqüinos compactos e expandidos após a exposição ao roscovitine por 24 horas (Teste exato de Fisher,  $p= 0,761$ ).....51
- Figura 20 -Aspecto dos (A) CCO eqüinos expandidos após 24 horas de incubação em roscovitine; (B) CCO eqüinos compactos após 24 horas de incubação em roscovitine; (microscópio estereoscópico, aumento de 40x).....52
- Figura 21 - Comparação das taxas de maturação nuclear de CCO eqüinos expandidos de acordo com a exposição ou não ao roscovitine por 24 horas após a colheita (Teste exato de Fisher,  $p= 0,942$ ).....52
- Figura 22 - Comparação das taxas de maturação nuclear de CCO eqüinos compactos de acordo com a exposição ou não ao roscovitine por 24 horas após a colheita (Teste exato de Fisher,  $p= 0,601$ ).....53
- Figura 23 -Estágio de maturação nuclear de CCO eqüinos compactos e expandidos após 30 horas de maturação *in vitro* (Teste exato de Fisher,  $p= 0,009$  e para comparar as proporções de degenerados Teste Z de proporções,  $p= 0,002$ ; a, b - letras diferentes sobre as colunas indicam diferença significativa).....54
- Figura 24 - Aspecto de expansão das células do *cumulus* de CCO eqüinos expandidos (A) e compactos (B) após 30 horas de maturação *in vitro* (microscópio estereoscópico, aumento de 40x).....54
- Figura 25 -Estágio de maturação nuclear de CCO eqüinos compactos e expandidos após a exposição ao roscovitine por 24 horas e 30 horas de maturação *in vitro* (Teste exato de Fisher,  $p= 0,387$ ).....55
- Figura 26 - Aspecto dos CCO eqüinos expandidos (A) e compactos (B) após 24 horas de incubação em roscovitine e 30 horas de maturação *in vitro* (microscópio estereoscópico, aumento de 40x para A e 80x para B).....55

- Figura 27 -Comparação das taxas de maturação nuclear de CCO eqüinos expandidos de acordo com a exposição ou não ao roscovitine por 24 horas antes da maturação *in vitro* (Teste exato de Fisher,  $p=0,714$ ).....56
- Figura 28 -Comparação das taxas de maturação nuclear de CCO eqüinos compactos de acordo com a exposição ou não ao roscovitine por 24 horas antes da maturação *in vitro* (Teste exato de Fisher,  $p=0,275$ ).....57
- Figura 29 -Gráfico de dispersão entre percentual de ovócitos eqüinos com formação de protrusão do material nuclear após 30 horas de maturação *in vitro* em três doses de demecolcina (0,05 $\mu$ g/ml; 0,1 $\mu$ g/ml e 0,2 $\mu$ g/ml).....58
- Figura 30 - Formação de protrusão em ovócitos bovinos e eqüinos com *cumulus* compacto e expandido expostos a demecolcina nas concentrações de 0,05 $\mu$ g/ml e 0,2 $\mu$ g/ml respectivamente, após 19 e 30 horas de maturação *in vitro*.....59
- Figura 31 - Ovócitos bovinos tratados com demecolcina (A e B) ovócito com formação de protrusão na região cortical (indicada pela seta), contendo todo o material nuclear (microscópio invertido, aumento de 400x).....60
- Figura 32 - Ovócitos eqüinos tratados com demecolcina (A a D) ovócitos com formação de protrusão na região cortical (indicada pela seta), e corpúsculo polar (indicado pelo \*) (microscópio invertido, aumento de 400x).....60
- Figura 33 - Percentual de descondensação da cromatina obtida às 24 horas a partir da ativação partenogenética de ovócitos bovinos utilizando-se quatro protocolos de ativação artificial e duas concentrações de cálcio no meio de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; E: estrôncio; 6 D: 6 DMAP).....62

- Figura 34 - Ovócitos bovinos ativados, (A) Dois ovócitos ativados (microscópio invertido, aumento de 400x); (B) Aspecto do núcleo descondensado após ativação (seta, microscópio invertido, aumento de 800x); (C) Núcleo iniciando condensação para formar primeira figura mitótica (seta, microscópio invertido, aumento de 400x); (D) Ampliação do núcleo da figura (C) (microscópio invertido, aumento de 800x).....63
- Figura 35- Ovócitos bovinos ativados, (A): Formação de núcleo em descondensação e presença de um corpúsculo polar; (B): Figura mitótica da primeira divisão com dois corpúsculos polares, (microscópio invertido, aumento 400x). (seta: corpúsculo polar)...63
- Figura 36 - Percentual de descondensação da cromatina obtida 24 horas após a ativação partenogenética de ovócitos eqüinos utilizando-se três protocolos de ativação artificial e duas concentrações de cálcio no meio de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; 6 D: 6 DMAP).....65
- Figura 37- Ovócitos eqüinos ativados, (A): ovócito rompido durante a manipulação com presença de núcleo descondensado com um corpúsculo polar (seta); (B) núcleo iniciando a formação da primeira figura mitótica (microscópio invertido, aumento 400x).....65
- Figura 38 - Ovócito eqüino ativado com a formação da primeira figura mitótica e dois corpúsculos polares (seta), (microscópio invertido, aumento 400x).....66
- Figura 39 -Percentual de clivagens obtidas aos três dias após a ativação partenogenética de ovócitos eqüinos utilizando-se três protocolos de ativação artificial e duas concentrações de cálcio no meio de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; 6 D: 6 DMAP).....67

- Figura 40 - A a D Clivagens incompletas de partenotos eqüinos com três dias de cultivo (seta: núcleos; \*: corpúsculo polar) (microscópio invertido, aumento 400x).....69
- Figura 41 -A e B Clivagem incompleta, quatro núcleos sem divisão citoplasmática de partenotos eqüinos com três dias de cultivo (seta: núcleos) (microscópio invertido, aumento 400x).....69
- Figura 42 - A a D Clivagens completas em duas células de partenotos eqüinos com três dias de cultivo (seta: núcleos, \*: corpúsculo polar) (microscópio invertido, aumento 400x).....70
- Figura 43 - A e B Clivagens completas em três células de partenotos eqüinos com três dias de cultivo (seta: núcleos) (microscópio invertido, aumento 400x).....70
- Figura 44 - A e B Clivagens completas em quatro células de partenotos eqüinos com três dias de cultivo (seta: núcleos) (microscópio invertido, aumento 400x).....71
- Figura 45 - A e B Clivagem completa, com oito núcleos de partenotos eqüinos com três dias de cultivo (seta: núcleos) (microscópio invertido, aumento 400x).....71
- Figura 46 – Descondensação de cromatina após ativação artificial de ovócitos eqüinos reconstituídos por meio de TN, o núcleo apresenta-se duas a três vezes maior do que o original da célula doadora, com nucléolo ou alguma cromatina condensada (microscópio invertido, aumento de 400x).....74

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Caracterização das clivagens pelo número de núcleos e blastômeros visíveis obtidos no dia 3 de cultivo após a ativação partenogenética de ovócitos eqüinos classificados como expandidos e compactos, utilizando-se três protocolos e duas concentrações de cálcio no meio de cultivo.....68

**SUMÁRIO**

Página

**RESUMO****ABSTRACT**

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Clonagem em animais.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Clonagem em eqüideos.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Qualidade dos citoplastos receptores.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4 Enucleação ovocitária.....</b>	<b>12</b>
<b>2.5 Células doadoras de núcleos.....</b>	<b>14</b>
<b>2.6 Reconstituição.....</b>	<b>15</b>
<b>2.7 Ativação artificial.....</b>	<b>16</b>
<b>2.8 Reprogramação nuclear.....</b>	<b>20</b>
<b>2.9 Problemas associados à clonagem por transferência nuclear..</b>	<b>21</b>
<b>2.10 Diferenças entre os clones e os doadores de núcleo.....</b>	<b>23</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>

<b>4.1 Experimento I.....</b>	<b>26</b>
4.1.1 <i>Obtenção e manutenção de linhas celulares de fibroblastos eqüinos de animais adultos.....</i>	<i>26</i>
4.1.2 <i>Congelação e descongelação das linhas celulares de fibroblastos eqüinos de animais adultos.....</i>	<i>28</i>
4.1.3 <i>Sincronização do ciclo celular de fibroblastos eqüinos de animais adultos.....</i>	<i>29</i>
4.1.3.1 <i>Integridade de membrana.....</i>	<i>30</i>
4.1.3.2 <i>Ciclo celular.....</i>	<i>30</i>
<b>4.2 Experimento II.....</b>	<b>31</b>
4.2.1 <i>Colheita, seleção e classificação de ovócitos eqüinos.....</i>	<i>31</i>
4.2.2 <i>Uso do roscovitine na maturação nuclear de ovócitos eqüinos.....</i>	<i>34</i>
4.2.3 <i>Maturação in vitro de ovócitos eqüinos.....</i>	<i>35</i>
4.2.4 <i>Avaliação da configuração nuclear de ovócitos eqüinos.....</i>	<i>35</i>
<b>4.3 Experimento III.....</b>	<b>36</b>
4.3.1 <i>Colheita seleção e maturação in vitro de ovócitos bovinos.....</i>	<i>36</i>
4.3.2 <i>Enucleação Química de Ovócitos Eqüinos e Bovinos.....</i>	<i>37</i>
4.3.2.1 <i>Fase I.....</i>	<i>37</i>
4.3.2.2 <i>Fase II.....</i>	<i>37</i>

<b>4.4 Experimento IV</b> .....	<b>38</b>
4.4.1 <i>Ativação partenogenética de ovócitos bovinos</i> .....	38
4.2.2 <i>Ativação partenogenética de ovócitos eqüinos</i> .....	40
<b>4.5 Experimento V</b> .....	<b>43</b>
4.5.1 <i>Transferência Nuclear em Eqüinos</i> .....	43
<b>4.6 Metodologias Estatísticas</b> .....	<b>47</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
<b>5.1 Experimento I</b> .....	<b>48</b>
5.1.1 <i>Sincronização do ciclo celular de fibroblastos eqüinos de animais adultos</i> .....	48
5.1.1.1 <i>Integridade de membrana</i> .....	48
5.1.1.2 <i>Ciclo celular</i> .....	49
<b>5.2 Experimento II</b> .....	<b>50</b>
5.2.1 <i>Colheita, seleção e classificação de ovócitos eqüinos</i> .....	50
5.2.2 <i>Uso do roscovitine na maturação nuclear de ovócitos eqüinos</i> .....	50
<b>5.3 Experimento III</b> .....	<b>57</b>
5.3.1 <i>Colheita seleção e maturação in vitro de ovócitos bovinos</i> .....	57
5.3.2 <i>Enucleação Química de Ovócitos Eqüinos e Bovinos</i> .....	57
5.3.2.1 <i>Fase I</i> .....	57
5.3.2.2 <i>Fase II</i> .....	58

<b>5.4 Experimento IV</b> .....	<b>61</b>
5.4.1 <i>Ativação partenogénica de ovócitos bovinos</i> .....	61
5.4.2 <i>Ativação partenogénica de ovócitos eqüinos</i> .....	64
<b>5.5 Experimento V</b> .....	<b>71</b>
5.5.1 <i>Transferência Nuclear em Eqüinos</i> .....	71
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>94</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>96</b>

FERNANDES, C. B. **Clonagem em eqüinos por meio de transferência nuclear**. Botucatu – SP. 2008. 117p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

## RESUMO

Nos eqüideos o primeiro relato de sucesso na clonagem foi em Idaho – EUA, em maio de 2003 com o nascimento de uma mula clonada a partir de células fetais, e desde então esta biotecnologia contabiliza somente 21 eqüideos clonados no mundo. A clonagem em eqüideos é extremamente difícil, pois os ovócitos não maturam bem *in vitro*, o que diminui significativamente a disponibilidade de citoplastos receptores de qualidade. Além disso, a dificuldades na obtenção de material em matadouros comerciais, o alto custo de manutenção dos animais em fazendas, bem como as baixas taxas de produção de blastocistos por transferência nuclear (3 a 10%) fazem com que poucos laboratórios se dediquem aos estudos dos processos envolvidos na produção *in vitro* de embriões de eqüideos. Sendo assim, este projeto teve como objetivo geral criar no Laboratório de Produção *in vitro* da FMVZ – UNESP - Botucatu, condições para a produção no Brasil de eqüideos clonados. No experimento I não foram observadas diferenças significativas ( $p = 0,661$ ) entre a privação de soro fetal bovino e a confluência na integridade de membrana de fibroblastos eqüinos em cultivo pós-descongelamento (>87%). Sob as mesmas condições de cultivo, foram avaliadas as taxas de sincronização do ciclo celular de fibroblastos eqüinos em G0/G1 na tentativa de estabelecer um protocolo de utilização destas células como doadoras de núcleo. As mais altas taxas de células sincronizadas em G0/G1 (> 97%) foram obtidas às 72, 96 e 168 horas após o início da privação de soro fetal bovino a 0,5%. No experimento II a incubação de ovócitos eqüinos em 66µg/ml de roscovitine por 24 horas, pré e pós-maturação *in vitro*, foi eficiente na inibição da meiose, sincronizando o início do processo, permitindo uma melhor programação das rotinas de transferência nuclear e se mostrando reversível frente taxas de maturação nuclear semelhantes ( $p = 0,714$  para CCO expandidos e  $p = 0,275$  para CCO compactos) às obtidas para ovócitos não expostos a droga. No

experimento III foi avaliada a eficiência do uso da demecolcina na enucleação química de ovócitos e não foram observadas diferenças significativas na incubação dos ovócitos eqüinos por 2 horas após o período de maturação *in vitro* em doses de 0,05µg/ml, 0,10µg/ml e 0,20µg/ml de demecolcina ( $p = 0,141$ ). No entanto, numericamente a dose de 0,20µg/ml pareceu benéfica às taxas de protrusão da placa metafásica em ovócitos eqüinos (44,89%). Sendo assim, em uma segunda fase do experimento, foram obtidos 38,76%, 23,64% e 28,30% de enucleação positiva em ovócitos bovinos e eqüinos classificados como compactos e expandidos, respectivamente. No experimento IV ovócitos bovinos e eqüinos após 24 e 30 horas de maturação *in vitro* respectivamente, foram submetidos à ativação artificial. Para os ovócitos bovinos ativados em meio contendo alto cálcio, os protocolos com ionomicina acrescida de cicloheximide (65,12%) e roscovitine (60,16%) foram superiores ao ionomicina + estrôncio (40,82%) e não diferiram estatisticamente do grupo ionomicina + 6 DMAP (48,89%). Para os ovócitos bovinos ativados em baixa concentração de cálcio, os protocolos com ionomicina acrescida de roscovitine (48,84%) e 6 DMAP (40,82%) foram superiores ao ionomicina + estrôncio (19,05%) e não diferiram estatisticamente do grupo ionomicina + cicloheximide (34,78%). Dessa maneira dentro do mesmo protocolo de ativação artificial comparando as duas concentrações de cálcio, foram obtidas diferenças significativas somente nos grupos ionomicina acrescida de cicloheximide ( $p=0,001$ ) e estrôncio ( $p=0,002$ ), sendo que as altas concentrações de cálcio pareceram benéficas ao cultivo. Na ativação artificial de CCO eqüinos expandidos, em alta concentração de cálcio, o protocolo ionomicina + 6 DMAP (54,46%) foi superior ao ionomicina acrescida de cicloheximide (17,39%) e roscovitine (16,28%). Para os CCO eqüinos expandidos, ativados em baixa concentração de cálcio, o protocolo com ionomicina acrescida de 6 DMAP (44,74%) foi superior ao ionomicina + cicloheximide (17,78%) e não diferiu estatisticamente do grupo ionomicina + roscovitine (26,00%). No entanto, quando ovócitos eqüinos com *cumulus* compacto foram utilizados não foi observada diferença entre os grupos. A produção e número de células de embriões eqüinos partenogénéticos foi baixa, independente do tratamento, ressaltando a baixa competência dos ovócitos eqüinos. No experimento V observou-se que o único efeito significativo sobre as taxas de descondensação da cromatina após a

transferência nuclear por meio de injeção direta da célula doadora de núcleo, foi o do estágio de maturação nuclear, independentemente da classificação do ovócito em compacto ou expandido, do protocolo de ativação artificial (ionomicina + roscovitine ou 6 DMAP) e da exposição prévia ou não ao roscovitine, o percentual de ovócitos com formação de núcleo descondensado no terceiro dia de cultivo foi significativamente maior para a metáfase II ( $p = 0,033$ ) em relação à metáfase I, e não houve efeito significativo de interação de nenhuma ordem entre os outros fatores analisados.

**Palavras chave:** Transferência Nuclear; Clonagem; Eqüinos; Ativação artificial; Enucleação química.

FERNANDES, C. B. **Equine Clonig Using Nuclear Transfer**. Botucatu – SP. 2008. 117p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

## **ABSTRACT**

In the equine species, the first reported success of a cloned animal took place in Idaho, USA, in May 2003 when a cloned mule was born. In order to produce this clone fetal cells were used. Since then only 21 cloned horses births were reported. Equine cloning is extremely complicated due to difficulties in oocyte *in vitro* maturation, wich significantly reduce the availability of good quality oocytes to receive the genetic material of the donor cell. Moreover, the low number of commercial slaughterhouses, the high cost of maintenance of animals in the farms and the low efficiency of the method (3 to 10% blastocyst development) leads to the fact that only a few laboratories around the word are dedicated to study the process involved in horse embryos *in vitro* production. The main objective of the present experiment was to create, at the *In Vitro* Fertilization Laboratory from FMVZ – UNESP - Brazil, conditions to produce a equine clone. With this aim, five experiments were performed. In Experiment I no statistic differences ( $p = 0.661$ ) were observed with the utilization of serum starvation or culture until confluence on viability of equine fibroblasts cultured after thawing (>87%). With the attempt of establishing a protocol to use these cells as nuclear donors, the cell cycle of equine fibroblasts were studied under the same conditions. The higher rates of cell cycle synchronization in G0/G1 (> 97%) were obtained 72, 96 and 168 hours after the beginning of serum starvation (0.5% fetal calf serum). In the Experiment II, the incubation of equine oocytes with 66 $\mu$ g/ml of roscovitine during 24 hours, pre- and post- *in vitro* maturation, was efficient in inhibit meiosis, allowing a better organization of the nuclear transfer procedure. The meiosis blockage showed to be fully reversible after the removal of the roscovitine when nuclear maturation rates were compared with non-exposed oocytes ( $p = 0,714$  for expanded COC and  $p = 0,275$  for compact COC). In the experiment III the efficiency of the use of demecolcine for chemical enucleation of equine and bovine oocytes was tested. No statistic differences

on positive enucleation rate were observed after 2 hours incubation of equine oocytes in media with 0.05 $\mu$ g/ml, 0.10 $\mu$ g/ml e 0.20 $\mu$ g/ml of demecolcine ( $p = 0,141$ ). However the dose of 0.20 $\mu$ g/ml was numerically superior, since the rate of protusion of the nuclear material was 44.89%. In a second phase of the experiment 38.76%, 23.64% and 28.30% of positive enucleation was obtained with bovine oocytes, and compact and expanded equine oocytes respectively. On experiment IV bovine oocytes matured for 24 hrs and equine oocytes matured for 30 hrs were submitted to artificial activation. For bovine oocytes activated in medium with high  $Ca^{++}$  concentration the protocols with Ionomycin associated with cicloheximide (65.12%) and roscovitine (60.16%) were superior to the use of ionomycin + estrontium (40.82%). When low  $Ca^{++}$  concentrations were used better results were obtained with ionomycin + roscovitine (48.84%) and 6 DMAP (40.82%) compared with ionomycin + estrontio (19.05%). When the data from the same protocol was analyzed the high concentration of  $Ca^{++}$  in the media was beneficial only for the protocols using ionomycin + ciclohexemide ( $p=0.001$ ) and ionomycin + estrontio ( $p=0.002$ ). For expanded equine COC activated in high  $Ca^{++}$  concentrations the use of Ionomycin + 6 DMAP (54,46%) was superior to Ionomycin + ciclohexemide (17.39%) or roscovitine (16.28%). However, when low  $Ca^{++}$  concentrations were used no differences were observed between the protocol using ionomycin + 6 DMAP (44.74%) or roscovitine (26.00%) with both been superior than the Ionomycin + ciclohexemide (17.78%). However no differences between treatments were observed in cumulus comparct equine oocytes independently of the  $Ca^{++}$  concentration utilized. The production of partenogenetic embryos was low in all treatments tested indicating the low developmental competence of the used oocytes. On experiment V the only significant effect on chromatin descondensation after nuclear transfer was the stage of nuclear maturation of the recipient oocytes independently of state of cumulus cells, activation protocol of exposure or not to the roscovitine. The percentage of success was significantly higher when MII oocytes were used ( $p = 0.033$ ).

**Key words:** Nuclear transfer; Cloning; Equine; Artificial activation; Chemical enucleation.

## 1 INTRODUÇÃO

O final do século XX foi marcado pelo desenvolvimento de importantes biotecnologias voltadas a reprodução animal, como a transferência e produção *in vitro* de embriões. Esse avanço culminou no desenvolvimento, em 1997, de uma das tecnologias de maior impacto na área biológica, a clonagem de um mamífero adulto (Prof. José Antônio Visintin – USP, São Paulo).

Nos eqüídeos o primeiro relato de sucesso na clonagem foi em Idaho – EUA, em maio de 2003 com o nascimento de um mular clonado a partir de células fetais, e desde então esta biotecnologia contabiliza somente 21 eqüídeos clonados no mundo. A clonagem em eqüídeos é extremamente difícil, pois os ovócitos não maturam satisfatoriamente *in vitro*, diminuindo significativamente a disponibilidade de citoplastos receptores de qualidade. Além disso, aparentemente as células eqüínas apresentam baixas concentrações de cálcio intracelular, o que seria responsável por um baixo desenvolvimento *in vitro* dos embriões clonados (WOODS et al., 2003).

No Brasil, poucos laboratórios têm se dedicado aos estudos dos processos envolvidos na produção *in vitro* de embriões de eqüídeos. E, ao contrário do que se observa em bovinos, os avanços em técnicas da reprodução ocorrem mais lentamente para eqüídeos. Esse fato se deve principalmente a dificuldades na obtenção de material em matadouros comerciais, ao alto custo de manutenção dos animais em fazendas, bem como às baixas taxas de produção de blastocistos por transferência nuclear (3 a 10%). Entretanto, em face da dimensão do rebanho nacional e ao crescimento do mercado para o cavalo brasileiro como o terceiro maior rebanho eqüino do mundo, com mais de seis milhões de cabeças, ocupando diretamente mais de um milhão de pessoas no país (FAO em 2002), a demanda por técnicas que melhorem o desempenho reprodutivo e propiciem a preservação de material genético de eqüídeos tem aumentado consideravelmente. Hoje, não se pensa mais no cavalo apenas como animal de lazer, ou instrumento de batalha ou tração, o desbravamento de novas áreas produtivas faz com que a eqüinocultura forme, hoje no Brasil, uma importante cadeia de agronegócios, com forte inter-relação com setores ligados ao lazer, cultura e turismo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Clonagem em animais

Clonagem é a produção de organismos genômicamente idênticos, por meio assexuado (SEIDEL, 1983). Embora comum em plantas e alguns animais inferiores, a reprodução assexuada não é observada em vertebrados. As primeiras pesquisas com clonagem foram realizadas na década de 50 com anfíbios, e estudaram a capacidade de uma célula embrionária individual (doadora) em se diferenciar em um novo indivíduo após transplante para um citoplasto receptor (BRIGGS e KING, 1952). Devido aos inúmeros insucessos utilizando células adultas como doadoras de núcleo, acreditava-se que a clonagem de vertebrados adultos não seria possível. Os primeiros resultados considerados animadores para a clonagem em mamíferos foram obtidos por Willadsen (1986), com o nascimento de ovinos clonados por meio de transferência nuclear (TN) utilizando-se embriões de 8 a 16 células como doadoras de núcleo.

O desenvolvimento da técnica com células embrionárias e o crescente interesse da indústria e de diversos centros de pesquisa na multiplicação de animais genômicamente idênticos fez com que novos estudos fossem realizados. O relato do nascimento da ovelha Dolly (WILMUT et al., 1997), primeiro clone produzido a partir de células de um outro animal, mostrou ser possível à produção de cópias genômicas de um mamífero adulto. Desde então, a produção de clones por transferência nuclear de células somáticas e fetais tem sido empregada com sucesso em várias espécies como ovinos, bovinos, suínos, murinos, leporinos, roedores, muares, eqüideos, felinos e caninos (FULKA et al., 2004; LEE et al., 2005). Porém, a eficiência da clonagem ainda é extremamente baixa, pois é um processo que envolve uma complexa combinação de fatores tanto biológicos como técnicos que interagem entre si, muitos dos quais ainda não são compreendidos (WELLS, 1999).

A transferência nuclear de células somáticas é um instrumento importante na multiplicação de animais com genótipo único e para preservação de espécies ameaçadas de extinção. Essa técnica representa uma das mais extraordinárias conquistas da pesquisa na área de biotecnologia do

desenvolvimento (WILMUT et al, 1997). Entretanto, apesar de possível, a taxa de sucesso na clonagem de animais superiores é, na maioria das vezes, inferior a 1% (SOLTER, 2000). Além disso a transferência nuclear tem resultado no aparecimento de diversos problemas de desenvolvimento, como um alto índice de abortamento e de morte perinatal (HEYMAN et al., 2002; HILL et al., 1999; WILMUT et al., 1997). Não está claro, no entanto, se as falhas no desenvolvimento dos embriões clonados está relacionada à reprogramação nuclear incompleta, ou é intrínseca ao processo de clonagem (HAN et al., 2003).

A reconstituição pela técnica de transferência nuclear envolve a obtenção de células doadoras de núcleo, bem como de ovócitos doadores de citoplastos maturados *in vivo* ou *in vitro*. Por meio de um micromanipulador, a região do citoplasma na qual se encontra a cromatina do ovócito doador é removida, criando assim um ovócito enucleado, ou citoplasto. As células somáticas doadoras de núcleo são obtidas *in vitro* por meio de cultivo de amostras de tecidos (ex: biópsia de tecido). Uma célula somática do doador é selecionada e combinada com o citoplasto promovendo a reconstrução embrionária por meio da fusão dos dois tipos celulares com pulsos elétricos ou quebra da membrana da célula doadora de núcleo e injeção da mesma diretamente dentro do citoplasto receptor. Após a reconstituição, promove-se a ativação artificial que simula os eventos da fertilização convencional, onde o núcleo é descondensado e inicia-se o cultivo e desenvolvimento embrionário. Finalmente a transferência dos embriões produzidos à receptoras (HINRICHS 2005). Se qualquer um destes passos for realizado em condições sub-ótimas, a produção dos embriões clonados será influenciada.

## **2.2 Clonagem em eqüídeos**

Em eqüídeos, o primeiro sucesso na clonagem foi relatado em 2003 após o nascimento de três muaras a partir de células somáticas originadas de um feto com 45 dias de idade e transferidas a ovócitos maturados *in vivo* (WOODS et al., 2003). No mesmo ano, na Itália, foi reportado o nascimento de uma potra clonada a partir de célula de um animal adulto transferida a um ovócito maturado *in vitro* (GALLI et al, 2003). O interessante neste caso é que a

doadora de células somáticas foi também à receptora do embrião clonado, abrindo novas perspectivas para o estudo das inter-relações materno-fetais.

Com a clonagem pode-se prolongar a linhagem genética de animais superiores, com infertilidade adquirida, como animais mortos e machos castrados precocemente incapazes de se reproduzir e ainda de prover material para pesquisas. Tendo em vista o insucesso da fertilização *in vitro* em eqüinos, a clonagem poderia fornecer material experimental necessário para as pesquisas de desenvolvimento embrionário precoce, reações imunológicas em éguas prenhes gestando seus próprios clones e a contribuição do DNA mitocondrial no fenótipo ao nascimento. Segundo Dr Galli (Universidade de Cremona, Itália) a clonagem de animais valiosos é somente o marketing, vislumbrando a possibilidade de uso da técnica na criação de animais genômicamente modificados para aplicações bioquímicas.

A clonagem em eqüídeos é extremamente difícil, devido à dificuldade de obtenção de citoplastos receptores. Além disso, existe a ineficiência de protocolos e resultados de produção *in vitro* (PIV) para a espécie eqüina, já que infelizmente o grande número de sucessos da PIV em outras espécies não se repete para os cavalos. Somente dois potros foram produzidos por meio de PIV e em ambos os casos foram utilizados ovócitos maturados *in vivo* colhidos por meio de aspiração folicular transvaginal (TVA) (PALMER et al., 1991; BEZARD, 1992). Não há relatos de prenheses provenientes de ovócitos maturados e fertilizados *in vitro*. E isto se deve provavelmente à ineficiência na capacitação espermática (ALM et al., 2001), alterações da zona pelúcida (Dell ÁQUILA et al., 1999; HINRICHS et al., 2002a) e incompleta maturação *in vitro* (LI et al., 2001). Woods et al. (2003) ainda observaram que as células eqüinas apresentam baixas concentrações de cálcio intracelular, e este fato poderia ser responsável por um baixo desenvolvimento *in vitro* dos embriões clonados.

### **2.3 Qualidade dos citoplastos receptores**

Um fator importante no sucesso da TN é a qualidade do ovócito receptor. O citoplasto receptor é geralmente obtido por meio da enucleação de um ovócito maduro em estágio de Metáfase II (MII). Na espécie eqüina a obtenção de ovócitos viáveis para utilização em biotécnicas da reprodução

ainda é uma limitação. A colheita de ovócitos *in vivo* é dispendiosa e apresenta resultados insatisfatórios, uma vez que um número pequeno de ovócitos é obtido de folículos imaturos e somente um folículo maduro pode ser aspirado por seção (COOK et al, 1993). Além disso, os protocolos de maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos ainda não estão padronizados.

Na espécie eqüina a colheita de ovócitos provenientes de ovários de matadouro apresenta algumas dificuldades técnicas como a necessidade de incisão e curetagem individual da parede folicular auxiliada com intensas lavagens na tentativa de soltar o Complexo *cumulus* ovócito (CCO) da parede do folículo e isto se deve a uma característica da espécie eqüina, na qual existe uma íntima relação entre as células do CCO e as da teca folicular.

Durante a ovogênese em mamíferos, os ovócitos em desenvolvimento acumulam proteínas, RNAm e seus precursores no interior do citoplasma. Estas reservas são necessárias no início do desenvolvimento embrionário, após a fertilização, no período que antecede a ativação do genoma embrionário, o que ocorre em bovinos no estágio de 8 a 16 células (BARNES e EYESTONE, 1990). Desta forma o desenvolvimento do embrião depende nos primeiros três dias de desenvolvimento dos transcritos maternos e portanto, o sucesso da TN depende da qualidade do ovócito utilizado como citoplasma receptor. As condições para a maturação *in vivo* do ovócito eqüino são diferentes daquelas observadas em outros animais domésticos; não ocorre um pico pré-ovulatório de LH, mas sim um aumento progressivo dos níveis deste, o qual demora vários dias, atingindo concentrações máximas um dia após a ovulação (WHITMORE et al., 1973; IRVINE e ALEXANDER, 1994). As condições para a maturação *in vitro* também parecem ser diferentes. Em comparação com outras espécies, a maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos é baixa. Em média 60% dos ovócitos atingem metáfase II *in vitro* (Dell AQUILA et al., 1997a), comparado com até 97% em ovócitos bovinos (SHIOYA et al., 1988). As razões para esta falha do ovócito eqüino em atingir completa maturação *in vitro* não são totalmente conhecidas, mas a adição de fatores de crescimento, bem como a utilização de meios de cultivo alternativos tem se mostrado benéfico (LANDIM-ALVARENGA et al., 2002).

Recentes estudos têm demonstrado diferenças entre a competência meiótica de ovócitos eqüinos classificados quanto à expansão das células do

cumulus e da granulosa mural (FERNANDES et al., 2006). Ovócitos classificados como expandidos originam-se de folículos em estágio inicial ou tardio de atresia (HINRICHS e WILLIAMS, 1997), o que parece induzir a competência meiótica. Apesar da maior parte dos ovócitos expandidos se apresentarem em estágio de vesícula germinativa (VG) no momento da colheita (HINRICHS et al., 1993). Eles apresentam taxas de maturação mais altas (ALM e HINRICHS, 1996; HINRICHS e SCHMIDT, 2000), maturam mais rapidamente *in vitro* (HINRICHS et al., 1993; ZHANG et al., 1989) e requerem menos tempo para a produção das proteínas necessárias para a maturação quando comparados aos compactos (ALM e HINRICHS, 1996). No entanto, não foram observadas diferenças significativas para as taxas de produção de blastocistos entre ovócitos com *cumulus* compacto e expandido maturados *in vitro*, fertilizados por meio de injeção intracitoplasmática de gametas (ICSI), e cultivados em ovidutos de ovelhas (GALLI et al., 2007). Esta classificação deve compreender não somente as células do cumulus como também células da granulosa mural. Portanto ovócitos eqüinos com algum sinal de expansão mesmo que em células individuais, até expansão total do *cumulus* são classificados como expandidos. Ovócitos que não apresentam expansão tanto as células do cumulus como da granulosa mural são classificados como compactos (HINRICHS et al., 2002a; FERNANDES et al., 2006).

Outra peculiaridade da espécie eqüina é a presença de altas taxas de ovócitos degenerados após a maturação *in vitro*, o que pode reduzir em grande parte as taxas de metáfase II e conseqüentemente o número de ovócitos viáveis. Muitas vezes estes ovócitos degenerados são identificados somente após a maturação, no momento em que são retiradas as células do *cumulus* para o uso em biotecnologias como clonagem e ICSI. Estas alterações são mais evidentes em ovócitos provenientes de matadouro quando comparados aos provenientes de TVA, o que ressalta as altas taxas de degeneração relacionadas principalmente, às alterações pós-mortem nos ovários de matadouro (GALLI et al., 2007).

Uma alternativa interessante para melhor uso e aproveitamento dos ovócitos eqüinos provenientes de ovários de matadouro é a utilização de inibidores meióticos. A manutenção dos ovócitos no estágio de vesícula germinativa ou o manejo do início do período de maturação pode ser muito

pertinente em eqüinos devido às longas distâncias, reduzido número de matadouros e a dificuldade de colheita o que pode resultar em grandes quantidades de ovócitos finalizando o período de maturação *in vitro* no mesmo momento ou em horários inapropriados para as micromanipulações (CHOI et al., 2006b). Sendo assim, pode-se utilizar inibidores quinase específicos como o roscovitine, capaz de inibir a quebra da vesícula germinativa (QVG) em ovócitos bovinos (MERMILLOD et al., 2000) e eqüinos (FRANZ et al., 2002) por 24 e 32 horas respectivamente, sem comprometer a competência ovocitária futura, apresentando taxas de maturação e formação de blastocistos após ICSI (PETERSEN et al., 2006) semelhantes as obtida no grupo controle, reforçam a idéia de utilização da droga no protocolo de transferência nuclear.

## **2.4 Enucleação ovocitária**

A produção de citoplastos receptores é realizada por meio da enucleação ovocitária, com a retirada dos cromossomos presentes nos citoplasmas de ovócitos em metáfase II. Este processo é essencial na transferência nuclear para a manutenção da ploidia correta. Em bovinos, suínos e principalmente em eqüinos, devido à presença de uma grande quantidade de lipídeos intracelulares torna-se difícil à visualização da placa metafásica com a microscopia de campo claro. Esta característica impede a enucleação sem o auxílio de um corante específico de DNA. O corante mais utilizado é o Hoechst 33342, o qual sob excitação à luz ultravioleta (UV), permite a visualização da cromatina e a confirmação da enucleação. No entanto, a exposição à UV pode provocar danos aos ovócitos e à membrana plasmática (SMITH, 1993), afetar o fator promotor de maturação (MPF), causar quebras no DNA nuclear, levando à alteração no DNA mitocondrial (DOMINKO et al., 2000) e no metabolismo do embrião reconstituído (RUSSEL et al., 2005) sendo, portanto, prejudicial ao desenvolvimento embrionário (PRATHER et al., 1987; SMITH, 1993).

A remoção de parte do citoplasma adjacente à placa metafásica no momento da enucleação, também pode promover injúrias ao citoplasto receptor pela retirada de RNAm, proteínas e precursores moleculares essenciais ao desenvolvimento embrionário inicial (BARNES e EYESTONE, 1990). A

remoção de citoplasma próximo ao corpúsculo polar (CP) sem coloração não é um método seguro para remoção da cromatina, pois, na espécie eqüina, o primeiro corpúsculo polar está freqüentemente deslocado da posição esperada em relação à metáfase (imediatamente adjacente) (DOMINKO et al., 2000).

Uma alternativa eficiente e menos invasiva para a realização da enucleação por meio da aspiração, sem causar injúrias ao ovócito, seria a enucleação química. Este método leva a redução mínima do volume citoplasmático e do conteúdo protéico e molecular (RUSSEL et al., 2005). Várias substâncias têm sido utilizadas para indução da enucleação química, incluindo o etoposídeo (KARNIKOVA et al., 1998), a colchicina e a demecolcina (IBÁNEZ et al., 2003).

A demecolcina é uma droga antimitótica que inibe a organização dos microtúbulos (HARI et al., 2003) e liga-se a dímeros de tubulina, evitando a polimerização dos microtúbulos, resultando assim na perda da dinâmica de fuso dos microtúbulos (RUSSEL et al., 2005). Como os microtúbulos e microfilamentos são responsáveis por mudanças estruturais nos ovócitos durante os eventos da maturação como QVG, condensação dos cromossomos, extrusão de CP e formação do fuso meiótico (LI et al., 2005), a sua desestruturação leva a alterações na dinâmica de formação e manutenção da placa metafásica II, facilitando a enucleação.

Os ovócitos em metáfase II submetidos ao tratamento por uma a duas horas, apresentam uma protrusão na região cortical ovocitária próxima ao primeiro corpúsculo polar, o qual contém o material nuclear condensado após a destruição do fuso. A remoção mecânica desta protrusão permite a retirada do material nuclear, sem a necessidade de coloração do mesmo. Essa técnica foi relatada em coelhos (YIN et al., 2002a), suínos (YIN et al., 2002b), murinos (GASPARRINI et al., 2003) e bovinos (LI et al., 2004; VAJTA et al., 2004). Em eqüinos, não há relatos de estudos da eficácia desta droga.

## 2.5 Células doadoras de núcleos

Diferentes tipos celulares em diversos estados de diferenciação têm sido utilizados como doadores de núcleos. Dentre eles estão, blastômeros, células tronco embrionárias, células fetais e células somáticas de animais adultos como células de glândula mamária (WILMUT et al., 1997), de oviduto (KATO et al., 1998), células do *cumulus* (KATO et al., 1998), musculares (SHIGA et al., 1999), uterinas (HWANG et al., 1999) e fibroblastos (HWANG et al., 1999). A preparação das células somáticas doadoras de núcleo é um fator importante no sucesso do processo de TN. Células somáticas têm sido cultivadas em meio contendo uma concentração reduzida de soro (Serum Starvation Culture) ou em uma cultura em alta confluência para induzir a inibição da mitose por contato, na tentativa de sincronizar o ciclo celular em um estágio quiescente denominado de G0 (CHO et al., 2002). No entanto diversos estudos questionam se a privação de soro beneficia a metodologia (SHIGA et al., 1999; CIBELLI et al., 1998), uma vez que dados demonstraram que células de bovinos escolhidas ao acaso de culturas em presença de soro também apresentavam totipotência após TN (CIBELLI et al., 1998; VIGNON et al., 1999).

A vida de uma célula é ritmada pelo ciclo celular, onde cada célula de um organismo sofre modificações cíclicas que a conduzem à divisão celular e a formação de duas células-filhas. O ciclo celular está dividido em quatro fases: a fase G1 (G para gap, que significa intervalo) durante a qual a célula cresce (devido às sínteses protéicas), a fase S (S para síntese) durante a qual a célula duplica seu DNA, a fase G2 que é uma outra fase de crescimento e a fase M (M para mitose) que representa a divisão celular propriamente dita (ALBERTS et al., 1989). Existem, entretanto, duas exceções nesse ciclo clássico. A primeira é constituída pelas células embrionárias que não apresentam a fase G1, cada fase M é imediatamente seguida por uma fase S. Utilizam-se então os termos interfase e mitose para caracterizar as fases do ciclo celular embrionário. A segunda exceção é constituída pelas células em fase G0, células quiescentes, extraciclo (ALBERTS et al., 1989).

De acordo com Cho et al. (2002) as células em G0 apresentam uma distribuição de micro-organelas que seria benéfica para a reprogramação após

a transferência nuclear. O aspecto principal da coordenação do ciclo celular entre o citoplasma receptor e o núcleo doador é a manutenção da ploidia normal na reconstrução do embrião por transferência nuclear. Para células doadoras que se encontram em fase S, ocorre falha no desenvolvimento embrionário por causa da fragmentação parcial do DNA replicado, levando a uma ploidia cromossômica incorreta. Dentre os estágios de divisão celular da célula doadora de núcleo os que são compatíveis com a manutenção da ploidia são principalmente as fases G0/G1 (COLLAS et al., 1992).

## **2.6 Reconstituição**

A técnica de micromanipulação empregada na transferência nuclear foi originalmente introduzida por Willadsen (1986) para clonagem de células embrionárias e posteriormente adaptada para células somáticas por Wilmut et al. (1997). Essa técnica que envolve microcirurgia e fusão celular e não requer o isolamento e a injeção do núcleo no interior do citoplasma, é atualmente utilizada em quase todos os laboratórios, apesar das desvantagens conhecidas, incluindo equipamento oneroso, tempo de trabalho consumido, necessidade de pessoas altamente qualificadas e hábeis e, geralmente, baixa eficiência do procedimento (VAJTA et al., 2004).

Pouca informação está disponível sobre a transferência nuclear em eqüinos. As taxas de eletrofusão entre ovócitos e células somáticas estão entre 20 e 67% (HINRICHS et al., 2000; CHOI et al., 2001a) e melhoram (82%) quando se combina a eletrofusão com vírus Sendai (LI et al., 2002). A transferência ou injeção direta da célula doadora de núcleo no interior do citoplasma receptor usando micropipeta apresentou 13 a 30% de reprogramação após ativação (LI et al., 2000). Choi et al. (2002a) obtiveram altas taxas de reconstituição com a utilização de Piezo drill na introdução da célula doadora de núcleo no ovócito eqüino enucleado quando comparado à eletrofusão (82% versus 20 a 48% - HINRICHS et al., 2000; CHOI et al., 2001a). Esta taxa de reconstituição é superior à obtida por outros laboratórios, exceto quando se utilizou eletrofusão associada ao vírus Sendai (LI et al., 2002).

Quando a injeção direta da célula doadora de núcleo é utilizada, existe a possibilidade de ocorrer quebra incompleta das membranas do ovócito e da célula doadora, resultando em falha da transferência. Além disso, quando comparada à técnica de transferência nuclear por eletrofusão, componentes do meio de cultivo assim como membranas celulares podem ser injetadas diretamente no citoplasma ovocitário (CHOI et al., 2002a). Estas interferências foram avaliadas por Choi et al. (2002a) por meio da transferência xenogênica de fibroblastos eqüinos para ovócitos bovinos com a utilização do Piezo drill para a injeção direta. Os resultados de reconstituição, clivagem e desenvolvimento embrionário até oito células foram 81%, 88% e 41% respectivamente, demonstrando a eficácia da metodologia e evidenciando os resultados superiores da transferência interespecie quando comparada à transferência eqüino – eqüino.

## **2.7 Ativação artificial**

Após a TN, o ovócito reconstituído tem que ser submetido ao processo de ativação partenogenética para que o desenvolvimento embrionário tenha início. No ovócito em MII, o bloqueio da meiose ocorre devido à atividade do MPF, da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e do fator citostático (CSF) ou do produto do proto-oncogene c-mos (Mos). O MPF é um dímero protéico formado pela ciclina B1 (subunidade regulatória) e pela proteína p34<sup>cdc2</sup> (subunidade catalítica) (HOMA, 1995). O MPF promove a ruptura do envelope nuclear desencadeia a condensação cromossômica. O CSF bloqueia a degradação da ciclina B, permitindo assim, a persistência da atividade do MPF (HOMA, 1995). Além disso, o CSF ativa a MAPK que é responsável pela manutenção do fuso meiótico (VERLHAC et al., 1994).

Na fertilização, após a penetração do espermatozóide, elevações transitórias e periódicas do cálcio (Ca<sup>2+</sup>) livre intracelular representam um dos principais eventos envolvidos no mecanismo de ativação ovocitária. As mudanças nos níveis de Ca<sup>2+</sup> e pH no ovócito resultam de uma cascata de eventos que envolvem a quebra de uma proteína de membrana, o fosfatidil inositol. A ligação do espermatozóide ativa a proteína G, localizada internamente na membrana plasmática do ovócito, a qual estimula a atividade

da fosfolipase C, localizada na face interna da membrana. A fosfolipase C causa hidrólise do fosfatidil inositol a diacilglicerol e inositol trifosfato (IP3). O diacilglicerol permanece na membrana plasmática ativando a bomba de  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$  responsável pelo aumento do pH. Em contraste o IP3 é liberado da membrana e se difunde no citoplasma onde se liga ao retículo endoplasmático e induz ao aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma. Este aumento nos níveis de cálcio é responsável pela ativação de uma série de reações metabólicas. Dentre elas, a ativação da enzima  $\text{NAD}^+$  kinase, que converte  $\text{NAD}^+$  em  $\text{NADP}^+$ , gerando importantes conseqüências para o metabolismo celular. Um outro efeito é a mudanças no consumo de oxigênio, uma vez que a enzima responsável pela redução do oxigênio (a peróxido de hidrogênio) é dependente do NADPH. Além disso, o aumento do pH intracelular de 6,8 para 7,2 ativa a síntese de proteínas e DNA (NURSE, 2000).

Paralelamente o aumento do cálcio livre intracelular inativa o CSF, promovendo a destruição da ciclina B, resultando na inativação do MPF (WHITE e YUE, 1996). O bloqueio da atividade do MPF permite a ocorrência dos eventos iniciais da ativação ovocitária, como a retomada da meiose, transição anáfase/telófase, extrusão do segundo corpúsculo polar, e excitose dos grânulos corticais. Entretanto, se o estímulo for insuficiente, não haverá inativação da MAPK e a atividade do MPF voltará rapidamente a ser restabelecida (LIU et al., 1998).

O tempo para a ocorrência da ativação ovocitária após a transferência da célula doadora de núcleo é um fator importante no sucesso da clonagem (CHOI et al., 2002a). Em ratos, o desenvolvimento embrionário de ovócitos ativados 1-6 horas após a injeção da célula doadora de núcleo foi significativamente maior do que ovócitos ativados imediatamente (WAKAYAMA et al., 1998). Estes autores relataram que houve a condensação do núcleo doador ocorre com 1 hora após a injeção. O nível alto do MPF no citoplasma receptor é o gatilho para a quebra da membrana nuclear e condensação da cromatina, o que se trata de um importante evento para a reprogramação da cromatina. No entanto, para a espécie eqüina ainda não existem informações sobre o melhor momento de realizar a ativação pós-reconstituição, Choi et al. (2002a) não obtiveram diferenças entre as taxas de desenvolvimento embrionário de ovócitos ativados 1,5-2 versus 8-10 horas após reconstituição.

Os principais métodos de ativação artificial de ovócitos baseiam-se na simulação da liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Vários métodos de ativação têm sido utilizados na TN, como pulso elétrico (ZIMMERMANN e VIENKEN, 1982), etanol (ILYIN e PARKER, 1992), ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  (NAKADA e MIZUNO, 1998) e estrôncio (YAMAZAKI et al., 2003). Ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  como a ionomicina e o A23187 promovem um aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente tanto do meio extracelular como da mobilização de estoques intracitoplasmáticos (NAKADA e MIZUNO, 1998). A ionomicina tem sido uma das fontes de ativação mais utilizada na clonagem somática em bovinos, apresentando boas taxas de desenvolvimento embrionário e gestação a termo quando combinada a 6-Dimetilaminopurina (6 DMAP) (GALLI et al., 1999; WELLS et al., 1998 e 1999). O 6 DMAP atua por meio da inibição de proteínas kinases, inibindo conseqüentemente a fosforilação de proteínas como a c-mos e a MAP kinase, reduzindo deste modo, as atividades do MPF. Para a clonagem de eqüinos foi utilizada a ativação por meio de uma combinação do ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  e de inibidores da síntese protéica (WOODS et al., 2003). Checura e Parrisch (2006) identificaram que o pico de cálcio intracitoplasmático nos ovócitos eqüinos ativados com ionomicina é aos 40 segundos após início do tratamento. Esses autores, utilizando 10 $\mu\text{M}$  da droga, obtiveram 17% de taxa de clivagem e 12% de partenotos com oito células às 48 horas de cultivo.

Um método alternativo de ativação descrito para camundongos é o emprego do estrôncio (BOS-MIKICH et al., 1997). O estrôncio induz aumentos repetidos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre intracelular (KLIN e KLIN, 1992) de modo semelhante ao que ocorre após a fertilização. O método de ativação por estrôncio tem se mostrado eficiente na ativação de ovócitos bovinos (MEO et al., 2004) e foi utilizado por pesquisadores da Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, em Jaboticabal, para a produção do primeiro clone de animal adulto produzido na América Latina (YAMAZAKI et al., 2003). Porém pouco se sabe sobre a aplicação destas drogas na espécie eqüina. Altas taxas de ativação partenogênica (52% formação de núcleo em descondensação e 24% de primeira divisão mitótica) foram obtidas utilizando-se ionóforo de cálcio A23187 seguido do cultivo com cicloheximide (CHOI et al., 2001a) um inibidor da síntese protéica e supressor da meiose (CHOI et al., 2006b). Carneiro et al. (2006) compararam três protocolos de ativação

partenogenética para ovócitos eqüinos: Grupo 1: ionóforo de cálcio combinado a 6 DMAP, Grupo 2: thimerosal com dithiothreitol (DTT), e Grupo 3: estrôncio com DTT. Não foram obtidas diferenças significativas entre as taxas de clivagem (38, 33 e 20%, respectivamente), no entanto observou-se uma melhor progressão no desenvolvimento embrionário até o estágio de mórula para o grupo que combinou ionomicina e 6 DMAP, o grupo 2 apresentou alta incidência de fragmentação enquanto o grupo 3 não progrediu a partir de 4 células. O estudo da partenogênese é um importante fator no entendimento dos aspectos fundamentais do desenvolvimento embrionário precoce. Entender os mecanismos da ativação partenogenética é relevante nas pesquisas com clonagem, visto que a ativação artificial do ovócito trata-se de um componente essencial nos atuais protocolos de TN (KIM et al., 1996), no entanto quando protocolos de ativação partenogenética foram aplicados a ovócitos eqüinos reconstruídos, somente 29% de ativação e 9% de clivagem foram obtidos (CHOI et al., 2001b).

Hinrichs et al. demonstraram em 2000 taxas de ativação e clivagem inferiores para ovócitos eqüinos enucleados quando comparado a ovócitos bovinos, após a fusão com célula somática eqüina. Com o intuito de pesquisar um competente ativador para os ovócitos eqüinos reconstituídos (CHOI et al., 2002b) fizeram uma analogia com a ICSI, onde obtiveram taxas de clivagem maiores de 70%, superiores às obtidas em ovócitos reconstituídos ou não, e ativados por metodologias químicas (CHOI et al., 2002a), sendo assim os espermatozóides parecem apresentar um fator espermático solúvel que explicaria a ativação do ovócito com a injeção do espermatozóide diretamente no citoplasma sem que haja sua interação com as proteínas G e tirosina quinases presentes no oolema (JAFFE, 1992; ABASSI e FOLTZ, 1994).

Com base nestes resultados, uma metodologia de ativação após transferência nuclear para a espécie eqüina foi proposta por Hinrichs et al. (2006a), que compararam a utilização de extrato de espermatozóide, ionomicina, uma combinação de ionomicina com 6 DMAP e uma combinação de extrato de espermatozóide com ionomicina, todos os tratamentos seguidos do cultivo em 6 DMAP por quatro horas. Os melhores resultados de produção de blastocistos foram entre a combinação de extrato de espermatozóide com ionomicina (12,5%). Outra droga que recentemente vem apresentando um bom

potencial de aplicação para a espécie eqüina é o roscovitine, um análogo purino que inibe a adesão do ATP ao Cdk1 (P34<sup>cdc2</sup>) subunidade do MPF, efetivo na supressão da meiose na espécie bovina e suína (MERMILLOD et al., 2000; MARCHAL et al., 2001), demonstrando ser eficiente e reversível também para a supressão da meiose em ovócitos eqüinos (FRANZ et al., 2003; CHOI et al., 2006a).

Além destas drogas, como já foi dito, o cálcio tem um papel fundamental no desencadeamento da ativação artificial em ovócitos de mamíferos. Pesquisas anteriores demonstraram que a concentração de cálcio no fluido folicular da égua é maior do que na vaca (WHITE et al., 2004). Somando-se a isso, o primeiro potro eqüideo produzido por transferência nuclear foi obtido cultivando e ativando os ovócitos em meio com a concentração de CaCl<sub>2</sub> três a seis vezes maior do que o previsto inicialmente (1,4mM) (WOODS et al., 2003). Segundo Dr Dirk Vanderwall, esta foi a chave para o progresso no projeto de clonagem desenvolvido na Universidade de Idaho.

Em geral ovócitos partenogeneticamente ativados não apresentam configuração cromossômica normal e a descondensação nuclear se inicia duas horas após a ativação e em 7-10 horas esta descondensação é total. Os corpúsculo polares são rapidamente degenerados e aproximadamente 25% dos ovócitos apresentam dois ou mais pro-núcleos, provavelmente decorrentes da descondensação de duas metades de cromossomos separados na Metáfase II (PRESICCE e YANG, 1994)

## **2.8 Reprogramação nuclear**

Não existem duvidas de que o núcleo de uma célula já diferenciada, quando transferido para o citoplasma de um ovócito enucleado, necessita ser re-programado para possibilitar o desenvolvimento completo de um novo indivíduo. Esta reprogramação inclui a remoção de diversos fatores epigenéticos que se ligam à cromatina durante a diferenciação celular. Os mecanismos envolvidos na reprogramação do núcleo ainda são pouco conhecidos. Vários estudos têm sido realizados para melhor compreender os eventos moleculares da reprogramação, incluindo: trocas de proteínas das lâminas nucleares (PRATHER et al., 1989 e 1991), alterações na morfologia

nuclear (KANKA et al., 1999) e trocas das proteínas de ligação ou histonas H1 (BORDIGNON et al., 1999). A reprogramação da H1 somática nos embriões reconstituídos é influenciada pelo estágio do ciclo celular e pela atividade de enzimas quinase. (BORDIGNON et al., 1999 e 2001). Modificações enzimáticas das histonas centrais, incluindo acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitilação, são exemplos de modificações dinâmicas na estrutura da cromatina. Estas modificações podem interagir com outros fatores epigenéticos e ter efeitos importantes sobre a regulação da expressão gênica (LI, 2002; JENUWEIN e ALLIS, 2001).

A reprogramação completa do núcleo de uma célula somática pelo ovócito receptor resultaria em um embrião com padrão de transcrição gênica similar àqueles produzidos *in vivo*. No entanto, uma vez que o núcleo doador precisa passar por uma série de modificações complexas, diferentes daquelas ocorridas durante a gametogênese, e dentro de um pequeno intervalo de tempo (até a transição materno-zigótica), acredita-se que a mortalidade ocorrida durante a gestação e nas fases pós-natal possa ser decorrente de uma reprogramação nuclear incompleta (RIDEOUT et al., 2001).

Os resultados de 40% dos embriões eqüinos clonados produzindo cinco potros saudáveis, obtidos pela equipe da Dra Katrin Hinrichs (Texas A&M University) em Fevereiro e Março de 2006, podem ser um bom indicativo que para a espécie eqüina os eventos envolvidos na reprogramação estejam acontecendo de uma forma adequada quando comparado às outras espécies, como a bovina.

## **2.9 Problemas associados à clonagem por transferência nuclear**

Embora animais de diferentes espécies tenham sido clonados a partir de células somáticas, o destino dos embriões produzidos por TN ainda é incerto. Atualmente o insucesso representa o resultado mais freqüente obtido com embriões clonados e o desenvolvimento normal representa as raras exceções (BORDIGNON et al., 2003). A baixa eficiência é conseqüência de diversos problemas que afetam os embriões clonados desde o estágio pré-implantação até o desenvolvimento pós-natal. Exemplos de problemas celulares detectados em embriões clonados no estágio de pré-implantação incluem: Anomalias

cromossômicas (BOOTH et al., 2003), alocação anormal do número de células no botão embrionário e trofotoderma (KOO et al., 2002) e formação deficiente do fuso mitótico (SIMERLY et al., 2003).

Embora uma proporção significativa dos embriões clonados possa clivar e se desenvolver até o estágio de blastocisto, a taxa de implantação é menor e as perdas fetais são, na maioria das vezes extremamente elevadas. Diversos estudos indicam que esta grande perda embrionária é, pelo menos em parte, devida a deficiências placentárias. As anomalias de placenta descritas em bovinos e ovinos incluem: irrigação sanguínea insuficiente, redução do número acompanhada de aumento de tamanho dos placentomas e aumento de ocorrência de hidroalantóide (CHAVATTE-PALMER et al., 2002; DE SOUSA et al., 2001; HILL et al., 1999 e 2001). Além de estar associada à perda de gestações, os problemas de placentação podem também contribuir na ocorrência de diversas anomalias que acarretam na menor viabilidade dos animais clonados. Diversas evidências sugerem o crescimento fetal anormal observado não só em animais clonados, como também naqueles produzidos por meio de técnicas de produção *in vitro*, pode estar associado a deficiências placentárias (BERTOLINI e ANDERSON, 2002).

Um estudo em bovinos demonstrou uma expressão anormal do complexo de histocompatibilidade maior do tipo I no trofoblasto e um maior acúmulo de linfócitos T no endométrio durante gestações de embriões clonados, quando comparado a animais controle (HILL et al., 2002). Estes resultados sugerem que uma rejeição imunológica também possa estar contribuindo para a grande incidência de perdas de gestações obtidas com embriões clonados.

Os problemas com animais clonados não terminam ao nascimento. Uma proporção importante dos clones são natimortos ou morrem dentro de poucos dias após o nascimento devido a anomalias que incluem: má formações cardíacas e circulatórias, disfunções respiratórias, deficiência imunológica, congestão e fibrose hepática, problemas renais ou até disfunções multisistêmicas (HILL et al., 1999; CHAVATTE-PALMER et al., 2002; RENARD et al., 1999; CIBELLI et al., 2002).

Em eqüinos, pelos dados publicados até o momento, dos 21 clones nascidos até hoje, somente um potro necessitou de assistência ao nascimento

pela prematuridade do parto (10 meses), resultando em óbito. No entanto, há indicativos de que 50% dos potros clonados apresentam problemas ao nascimento como contraturas de tendões, aumento da espessura do cordão umbilical e síndrome do mal ajustamento neonatal e necessitem de cuidados no nascimento. Além disso, existem relatos de óbitos por septicemias, pneumonias, artrites sépticas e ruptura de bexiga. Sendo assim, um maior número de animais deve ser produzido utilizando-se esta técnica para que conclusões definitivas possam ser estabelecidas (HINRICHS, 2007).

## **2.10 Diferenças entre os clones e os doadores de núcleo (HINRICHS, 2005).**

A possibilidade da clonagem abre novas áreas para o estudo, muitas opções clínicas a muitas questões éticas. No entanto, deve ser entendido que um potro clonado não é uma cópia exata do eqüino original. Há três grandes mecanismos pelos quais o fenótipo do indivíduo clonado pode diferir do doador de genética:

1. O embrião produzido por meio de transferência nuclear tem o DNA do doador de núcleo, mas o DNA mitocondrial é do ovócito receptor ou citoplasto. Uma pequena parte das mitocôndrias vem também com a célula doadora de núcleo, no entanto a proporção é baixa. O impacto desta fonte de mitocôndrias ou a mistura delas é desconhecido e estará presente nos ovócitos produzidos caso o clone seja de uma fêmea. No caso de um macho o DNA mitocondrial presente nos espermatozóides não irá participar do embrião após a fertilização, assim o macho produzirá espermatozóides com exatamente as mesmas características genéticas do animal doador de núcleo.

2. O fenótipo do potro pode ser afetado pelo ambiente uterino e pós natal. O ambiente uterino afeta não só o tamanho ao nascimento como o tamanho adulto e o fenótipo (TISCHNER & KLIMCZAK, 1989), como por exemplo, à velocidade de migração dos melanócitos no ambiente intrauterino que interfere nas características de pelagem. A produção de leite da mãe, e programas nutricionais e de treinamento aos quais os potros são expostos também influenciam o fenótipo do animal.

3. O desenvolvimento de clones pode ser influenciado também por fatores epigenéticos. Estes são mecanismos nos quais os genes são transcritos ou não na dependência de metilações. Como no momento da clonagem células já diferenciadas devem ser reprogramadas, muitos genes que não estavam sendo transcritos devem voltar a ser, enquanto genes transcritos devem parar, para que a nova célula seja reprogramada ao estágio embrionário e inicie o seu desenvolvimento. Como a reprogramação nuclear pode não ser perfeita nos fetos clonados, o status do DNA durante a vida fetal pode influenciar o fenótipo do animal antes e após o nascimento.

### 3 OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo geral criar no Laboratório de Produção *in vitro* da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, campus Botucatu, condições para a produção no Brasil, de eqüídeos clonados. Para tanto este trabalho visou:

#### 1. Experimento I:

Estabelecer um protocolo de cultivo celular, armazenamento e sincronização do ciclo celular de fibroblastos eqüinos de animais adultos, visando à utilização como fontes doadoras de núcleo.

#### 2. Experimento II:

Verificar a eficiência do uso do roscovitine como inibidor da meiose no preparo dos citoplastos receptores eqüinos.

#### 3. Experimento III:

Avaliar a eficiência da enucleação química por meio do uso de demecolcina no preparo de citoplastos receptores eqüinos.

#### 4. Experimento IV:

Estabelecer um protocolo de ativação artificial, utilizando-se ovócitos de bovinos e eqüinos como modelos experimentais.

#### 5. Experimento V:

Avaliar a eficiência do processo de transferência nuclear com a injeção direta da célula doadora de núcleo em citoplastos receptores eqüinos.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Experimento I**

#### **4.1.1 Obtenção e manutenção de linhas celulares de fibroblastos eqüinos de animais adultos**

Foram realizadas colheitas de fragmentos de pele de três fêmeas e três machos eqüinos (média 12 anos de idade, propriedade do Departamento de Reprodução Animal FMVZ – UNESP, Botucatu – SP, Brasil), com 1cm<sup>2</sup> de diâmetro (Figura 1 A a B). Os tecidos coletados em condições assépticas foram divididos em fragmentos de aproximadamente 1mm<sup>3</sup> com auxílio de lâmina de bisturi. O material foi lavado cinco vezes em tubo de centrifuga, com solução de PBS 0,1M livre de cálcio e magnésio [7,2g NaCl (Merck, 1064041000); 1,48g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, 1065860500); 0,43g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, 1048731000); 1000ml H<sub>2</sub>O destilada; pH 7.4], com auxílio de um agitador de tubos, desprezando o PBS 0,1M a cada lavagem. Para o cultivo o fundo de duas garrafas de cultivo foi umidecido com 1ml soro fetal bovino (SFB) (Gibco, 12657-029) aonde os fragmentos foram inseridos, as garrafas foram então inclinadas na posição vertical e adicionados 5 ml de meio completo DMEM (Gibco, 11995-065), 10% SFB, 100UI/ml Penicilina / 100µg/ml Estreptomicina (Sigma, P3539) e 3,0µg/ml Anfotericina B (Sigma, A9528), após 40 minutos em estufa 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar, as garrafas foram viradas para a posição horizontal, fazendo com que o meio de cultivo entrasse em contato com os tecidos. As garrafas permaneceram por aproximadamente sete dias em estufa 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar até o início do crescimento celular (Figura 2). O meio de cultivo completo foi trocado semanalmente e com 70% de confluência (Figura 3) foi realizada a tripsinização.

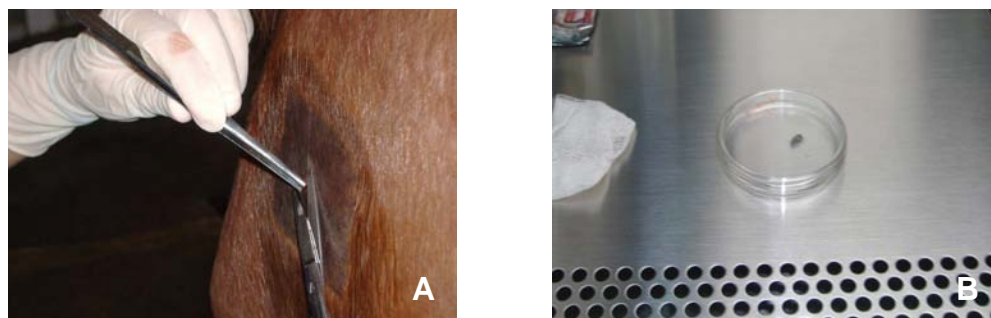


FIGURA 1 A - Colheita de tecido de pele eqüino para cultivo de fibroblastos; B - fragmento de pele coletado.



FIGURA 2 - Garrafas com fragmentos de pele em crescimento celular na estufa 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar.

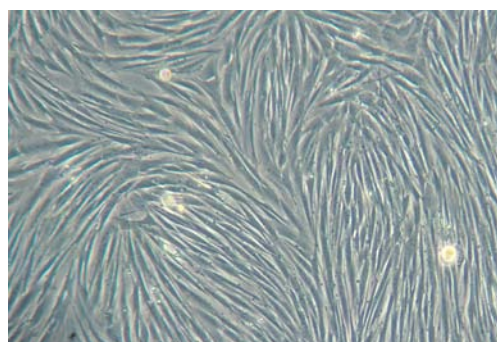


FIGURA 3 - Aspecto morfológico do cultivo primário de fibroblastos eqüinos em confluência (microscópio invertido com contraste de fase pH 1, aumento de 200x).

Para a tripsinização foi retirado todo meio de cultivo das garrafas, que foram lavadas com solução de PBS, e adicionadas de 2 ml de Tripsina Versene (Instituto Adolfo Lutz, 0,2% Tripsina e 0,02% Versene) à 36° C. As garrafas foram mantidas em estufa a 38,5° C por no máximo cinco minutos, e até que todas as células se soltassem do fundo. Realizou-se então a neutralização com meio DMEM acrescido de 20% de SFB e Penicilina/Estreptomicina, na proporção de 3:1 (meio / tripsina). Uma amostra de 50 µl desta mistura células + meio foi retirada e adicionada a 50 µl do corante Tripán Blue, com esta solução foi preenchida a Câmara de NewBauer e contadas as células translúcidas dos quatro quadrantes mais externos. As células azuis que permitem a passagem do corante estão mortas e as células translúcidas que não permitem passagem do corante estão vivas.

O valor encontrado foi colocado na fórmula:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ células contadas} \times 2 \text{ (fator de diluição)} \times 10^4}{4 \text{ (quadrantes lidos)}}$$

O resultado obtido é a concentração inicial (Ci), que foi colocado na próxima fórmula para identificar o quanto do volume inicial (Vi) das garrafas deve ser dividido para cada nova garrafa de cultivo celular:

$C_i \times V_i = C_f$  (concentração final,  $2 \times 10^5$ )  $\times V_f$  (volume final de meio na garrafa).

A tripsinização foi realizada mais duas vezes para que as células fossem congeladas em terceira passagem.

#### **4.1.2 Congelação e descongelação das linhas celulares de fibroblastos eqüinos de animais adultos**

Para a congelação, o tapete de células de cada garrafa foi tripsinizado como descrito acima e foi realizada a contagem de células viáveis em câmara de Newbauer. Após centrifugação, as células foram ressuspensas na concentração de  $2 \times 10^6$  células/ml em meio de congelação refrigerado (DMEM,

20% SFB, 10% dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma, D2650). Em seguida, foram distribuídas em criotubos (Corning®). Os criotubos foram acondicionados em um tubo especialmente desenvolvido para a troca lenta de calor e permaneceram 24 horas em freezer -80°C. Após este período transferidos diretamente ao N<sub>2</sub> líquido.

Para a descongelação os criotubos foram retirados do N<sub>2</sub> líquido e colocados em água à 37°C (até 1 minuto). Para a remoção do crioprotetor, o conteúdo do criotubo foi transferido a um tubo de centrifuga de 15ml (Corning®) onde se adicionou lentamente 10ml de meio DMEM, 20% SFB e centrifugou-se a 2000 rpm/ 5 minutos. O sedimento foi resuspendido em 5ml de meio DMEM, 20% SFB e novamente foi realizada a contagem do número de células viáveis para que pudéssemos adicionar 5x 10<sup>5</sup> células/ml em cada garrafa de cultivo celular para as análises de sincronização do ciclo celular e em placas de quatro poços (Nunc) para a utilização nos protocolos de transferência nuclear. Nestas garrafas/placas de cultivo os fibroblastos foram mantidos por aproximadamente cinco dias em estufa 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar.

#### **4.1.3 Sincronização do ciclo celular de fibroblastos eqüinos de animais adultos**

Os fibroblastos eqüinos em cultivo primário após a descongelação foram submetidos a dois protocolos de sincronização do ciclo celular: privação de soro (0,5%) e confluência, e avaliados quanto a integridade de membrana e fase do ciclo celular.

A privação de soro consistiu-se da redução de 10% para 0,5% no soro fetal bovino do meio de cultivo (DMEM acrescido de 0,5% SFB, 100UI/ml Penicilina/ 100µg/ml Estreptomicina e 3,0µg/ml Anfotericina B), e as análises foram realizadas as 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas de cultivo.

A confluência consistiu em permitir que o tapete de células na garrafa de cultivo se fechasse por completo, momento em que foram realizadas as análises.

#### 4.1.3.1 Integridade de membrana

A análise da integridade de membrana foi realizada por meio da marcação das células com corantes fluorescentes.

No período determinado para privação (24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas) e para confluência, o meio de cultivo da garrafa foi descartado e adicionado 0,5ml de PBS acrescido de 20µl de solução de Hoescht 33342 (10mg/ml, Sigma, B2261) por 30 minutos. Após este período foi adicionado 5 µl de solução de iodeto de propídio (1,0mg/ml, Sigma, P4170) por mais cinco minutos.

Foram avaliadas e contadas as células em cinco quadrantes de cada garrafa de cultivo sendo cinco repetições para o mesmo momento (microscopia de fluorescência, filtro azul, excitação: 450 a 490nm, aumento de 400X). As células viáveis se apresentavam com o núcleo de coloração azul a as células com membrana lesada (mortas) se apresentavam com o núcleo de coloração vermelha (Figura 4).

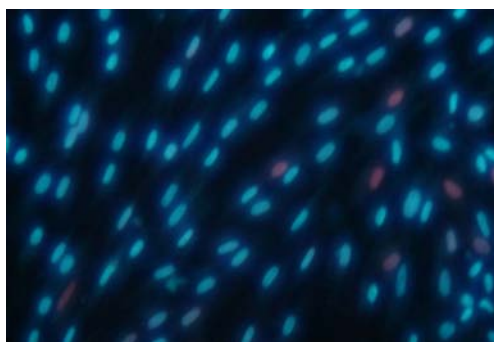


FIGURA 4 – Células em azul (viáveis) e células em vermelho (membrana lesada) (microscópio invertido, aumento de 400x).

#### 4.1.3.2 Ciclo celular

As células em cultivo, após a descongelação, nos períodos determinados, foram tripsinizadas, neutralizadas e tiveram a concentração ajustada para  $1 \times 10^5$  cél/ml, como descrito anteriormente. Em seguida foram centrifugadas a 2000rpm por 10 minutos e o sedimento ressuspensado em 1 ml da solução Cold GM (6,1mM Glicose (Sigma G6152); 137mM NaCl; 4,4mM KCl

(Merck 1049361000); 1,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,9mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5mM EDTA (Merck 108418025). Lentamente foi adicionado à solução, 3ml de etanol (Carlo Erba 414601002) à 4°C. As células foram fixadas por 30 minutos e após este período centrifugadas, lavadas e ressuspensas em PBS contendo 5mM EDTA acrescido de 16µl/ml de iodeto de propídio (50µg/ml) e 0,3µl/ml Rnase (0,3mg/ml, Sigma, R4875) e a suspensão final incubada por 1 hora a temperatura ambiente.

A leitura do estágio do ciclo celular (G0/G1) dos fibroblastos eqüinos foi realizada por meio do citômetro de fluxo FACS Calibur da BD<sup>®</sup> instalado no Hemocentro da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu.

## 4.2 Experimento II

### 4.2.1 Colheita, seleção e classificação de ovócitos eqüinos

Durante o período de estação de monta (Novembro de 2005 a Março de 2006, Setembro de 2006 a Março de 2007 e Setembro de 2007 a Dezembro de 2007) foram realizadas 20 rotinas de colheita de ovócitos eqüinos. Os ovários eqüinos foram obtidos em dois matadouros comerciais localizados a 500 km da cidade de Botucatu, lavados três vezes em solução fisiológica 0,9% (NaCl 0,9%), uma vez em álcool 70° e mais três vezes em solução NaCl 0,9% e transportados por aproximadamente 6 horas em solução NaCl 0,9% a 20-25°C, acondicionados em sacos plásticos dentro de caixa térmica até a chegada no laboratório. A colheita dos ovócitos foi realizada por meio da curetagem individual de folículos com 10 a 30 mm de diâmetro utilizando uma lâmina de bisturi e lavagem com PBS (Nutricell, Campinas SP) acrescido de 0,1% de heparina sódica (Figuras 5 A a E). Para classificação e seleção dos ovócitos foi utilizado líquido folicular eqüino obtido de folículos entre 10 e 30 mm de diâmetro previamente centrifugado (2000 rpm por 15 minutos).

Foram selecionados para o uso somente ovócitos que apresentaram ao menos uma camada células *cumulus*, citoplasma homogêneo e aspecto esférico (Figura 6). Os ovócitos selecionados foram classificados quanto à presença ou não de grupos de células do *cumulus* e granulosa mural

expandidas e divididos em dois grupos: grupo expandido (Figura 7 A e B) e grupo compacto (Figura 8 A e B).

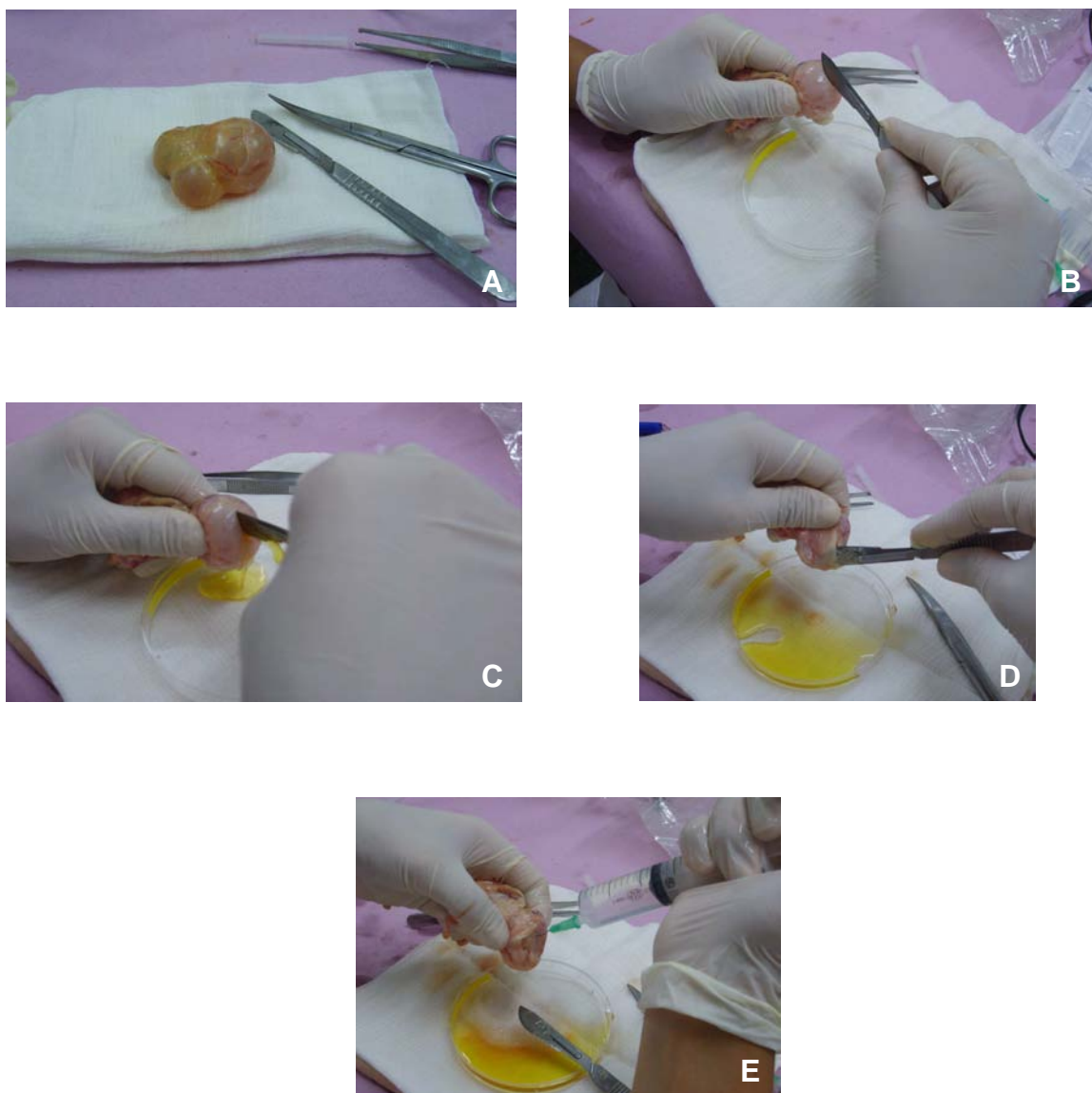


FIGURA 5 A a E – Seqüência de colheita de ovócitos eqüinos por meio de curetagem individual e lavagem de folículos com 10 a 30 mm de diâmetro.

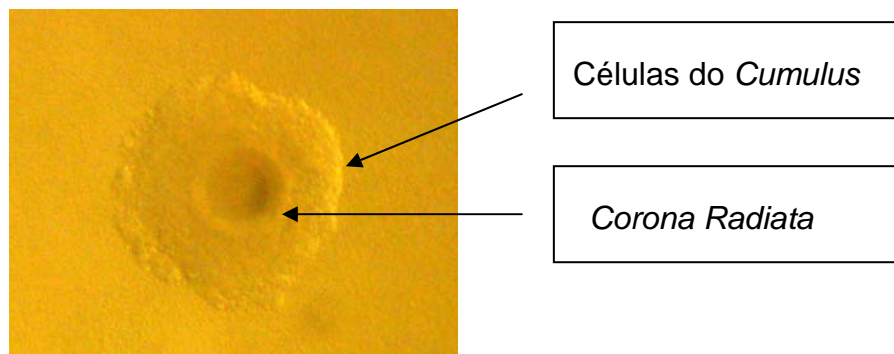


FIGURA 6 – Aspecto de um ovócito grau I proveniente de ovário de matadouro e selecionado para a maturação *in vitro* (microscópio estereoscópico, aumento de 40x).

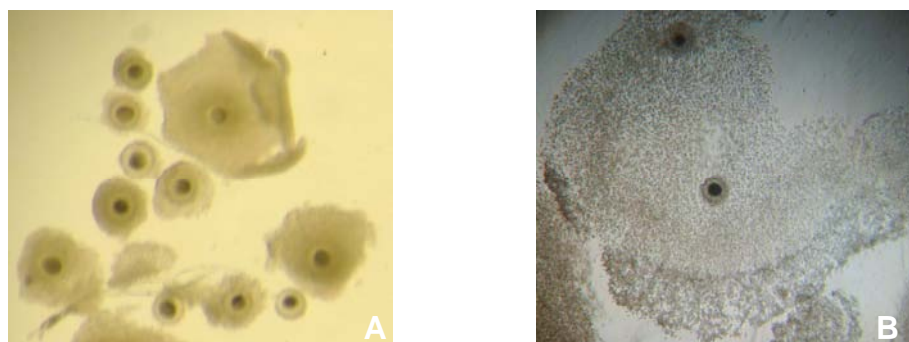


FIGURA 7 A e B – Aspecto dos ovócitos classificados como expandidos e selecionados para a maturação *in vitro* (microscópio estereoscópico, aumento de 40x).

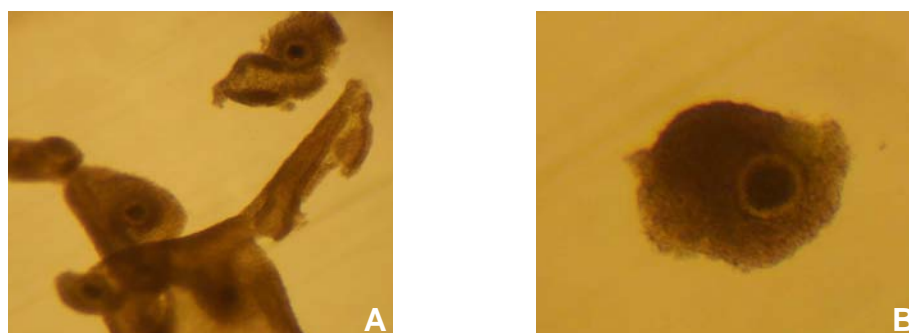


FIGURA 8 A e B – Aspecto dos ovócitos classificados como compactos e selecionados para a maturação *in vitro* (microscópio estereoscópico, aumento de 40x e 80x para as figuras A e B, respectivamente).

Após a classificação, os ovócitos eqüinos foram distribuídos em quatro grupos de avaliação do estágio de maturação nuclear (Figura 9):

1. Imaturos: os ovócitos foram avaliados imediatamente após a colheita.
2. Imaturos + roscovitine: os ovócitos foram avaliados após o cultivo por 24 horas em meio acrescido de Roscovitine.
3. Maturados: os ovócitos foram avaliados após 30 horas de maturação *in vitro*.
4. Roscovitine + maturados: após o período de 24 horas sob a ação do roscovitine os ovócitos eqüinos foram maturados *in vitro* por 30 horas e avaliados.

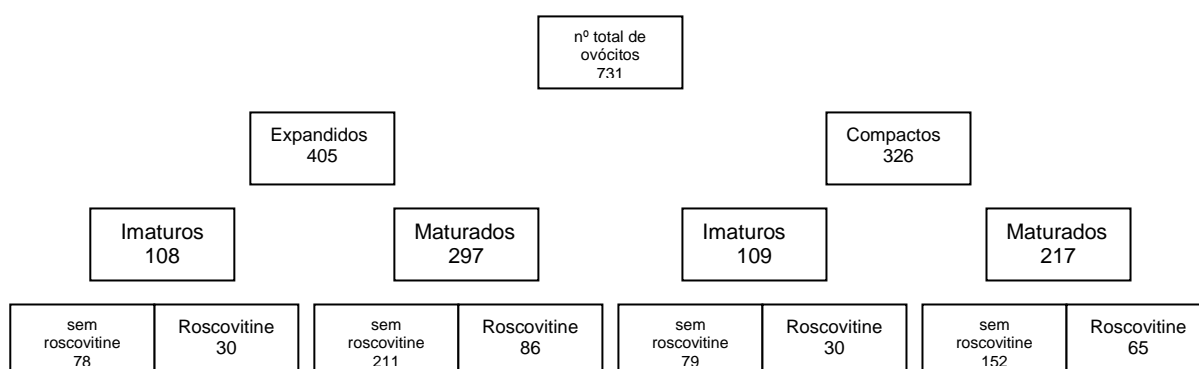


FIGURA 9 - Distribuição dos ovócitos eqüinos nos grupos experimentais de avaliação do estágio de maturação nuclear.

#### 4.2.2 Uso do roscovitine na maturação nuclear de ovócitos eqüinos

Tendo em vista a necessidade de atrasar da maturação nuclear em 24 horas com a utilização do roscovitine (Sigma, R7772) para um maior aproveitamento dos ovócitos eqüinos como doadores de citoplastos, os ovócitos imaturos foram cultivados (10µl de meio para cada ovócito) em meio TCM 199 (Gibco, 11150-059), acrescido de 10% de SFB (Sigma, F0643), 66µM roscovitine e 75µg/ml gentamicina (Sigma, G1264) em estufa a 38,5° C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade absoluta por 24 horas antes do início da maturação *in vitro*.

### 4.2.3 Maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos

Para a maturação *in vitro*, os ovócitos foram cultivados em placas NUNC com quatro poços contendo 400µl meio de maturação (10µl de meio para cada ovócito): HTF (Irvine Scientific 90125):BME (Gibco 21010046) (1: 1), 0,3% albumina sérica bovina (BSA) (Sigma, A4503) (0,8mg/ml), 0,32mM piruvato (Sigma, P2256), 1mM L-glutamina (Sigma, G3126), 0,4mM cisteína (Sigma, C1276), 0,1mM taurina (Sigma, T8691), 0,4mM glicina (Sigma, G8790), 3,3mM lactato de sódio (Sigma, L7900), 100ng/ml IGF-1 (Sigma, I1271), 50ng/ml EGF (Sigma, E4269), 100ng/ml eGH (Equigen), 5µg/ml eFSH (Bioniche), 500ng/ml estradiol (Sigma, E0130) e 75µg/ml gentamicina a 39°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade absoluta por 30 horas.

### 4.2.4 Avaliação da configuração nuclear de ovócitos eqüinos

Os ovócitos foram retirados do meio pré e pós período de maturação *in vitro*, e incubados em meio MEM hepes (Gibco 12360-038) acrescido de 5mg/ml de Hialuronidase tipo V (Sigma, H6254) onde foram extraídas as células da granulosa com auxílio de micropipeta de vidro e transferidos para gotas de 10µl de Hoescht 33342 em lâmina histológica, cobertos com lamínula e avaliados quanto à configuração cromossômica em microscópio invertido Leica- DMIRB luz UV filtro nº 2 (350 a 461 nm) e classificados pela presença de Vesícula Germinativa (VG), Quebra da Vesícula Germinativa (QVG), Metáfase I (MI), Metáfase II (MII) (Figura 10) e degenerados.

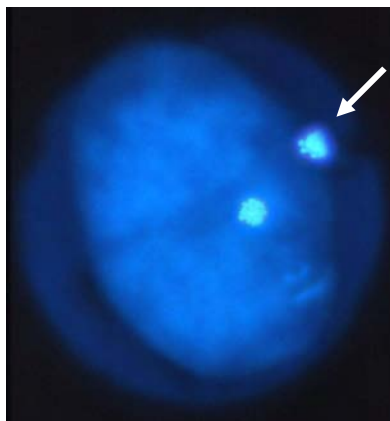


FIGURA 10 – Ovócito eqüino em Metáfase II após 30 horas de maturação *in vitro*. (seta: corpúsculo polar) (microscópio invertido, aumento de 400x).

### 4.3 Experimento III

#### 4.3.1 Colheita, seleção e maturação *in vitro* de ovócitos bovinos

Durante o experimento III foram realizadas 10 rotinas de colheita de ovócitos bovinos. Os ovários bovinos foram obtidos em matadouro comercial localizado a 100 km da cidade de Botucatu.

Os folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm foram aspirados utilizando-se agulha 30 x 8 mm acoplada a seringa de 5 ml e os ovócitos obtidos foram selecionados de acordo com a qualidade, ou seja, foram utilizados somente aqueles que apresentavam três ou mais camadas compactas de células do *cumulus*, com citoplasma de coloração homogênea, classificados como ovócitos grau I.

Os ovócitos selecionados foram maturados (10µl de meio para cada ovócito) em meio TCM 199 acrescido de 10% de SFB, 16µg/ml piruvato, 10µg/ml LH (Lutropin®), 10µg/ml FSH (Folltropin®), 1µg/ml estradiol e 75µg/ml gentamicina em estufa a 38, 5° C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade absoluta, por 24 horas.

### 4.3.2 Enucleação Química de Ovócitos Eqüinos e Bovinos

#### 4.3.2.1 Fase I

Após 30 horas de maturação 151 ovócitos eqüinos foram desnudados, como descrito no experimento II e submetidos ao tratamento com demecolcina (Sigma, D1925) nas concentrações de 0,05µg/ml (n 53); 0,1µg/ml (n 49) e 0,2µg/ml (n 49) adicionada ao meio de maturação. Após 2 horas de cultivo, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, e 90% de N<sub>2</sub>, completando-se 32 horas de maturação, os ovócitos foram removidos do meio suplementado com a droga, lavados três vezes em meio de lavagem (MEM hepes + 10% SFB + 75µg/ml gentamicina) e selecionados quanto à presença do 1º CP e da protrusão na região cortical ovocitária contendo a placa metafásica.

A confirmação da presença de material nuclear presente na protrusão foi realizada pela adição de 10µg/mL Hoescht 33342 ao meio de lavagem e avaliação em microscópio invertido Leica- DMIRB luz UV filtro nº 2 (350 a 461 nm).

#### 4.3.2.2 Fase II

Após 30 e 19 horas de maturação, os ovócitos eqüinos expandidos (n 55) e compactos (n 53) bem como os ovócitos bovinos (n 129) respectivamente, foram desnudados e submetidos ao tratamento com demecolcina (0,2 µg/mL para ovócitos eqüinos e 0,05µg/mL para bovinos) incluída no meio de maturação *in vitro*. Após o período de 2 horas de cultivo, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, e 90% de N<sub>2</sub>, completando-se 32 e 21 horas de maturação respectivamente, os ovócitos foram removidos do meio suplementado com a droga, lavados três vezes em meio de lavagem (MEM hepes + 10% SFB + 75µg/ml gentamicina) e selecionados quanto à presença de 1º CP e protrusão na região cortical ovocitária contendo a placa metafásica.

A confirmação da presença de material nuclear presente na protrusão foi feita pela adição de 10µg/mL Hoescht 33342 ao meio de lavagem e avaliação em microscópio invertido Leica- DMIRB luz UV filtro nº 2 (350 a 461 nm).

## 4.4 Experimento IV

### 4.4.1 Ativação partenogenética de ovócitos bovinos

Após o período de maturação *in vitro*, os ovócitos foram desnudados, selecionados quanto ao citoplasma homogêneo e divididos entre os grupos de ativação partenogenética (Figura 11):

Grupo Ionomicina + Cicloheximide com baixo cálcio:

Incubados em meio MEM hepes + 10% SFB + 5 $\mu$ M ionomicina (Sigma, I0634) por 8 minutos, lavados em MEM hepes + 10% SFB e incubados em meio MEM + 10% SFB + 10 $\mu$ g/ml cicloheximide (Sigma, C1988) + 5  $\mu$ g/ml citocalasina B (Calbiochem, 250233) por 4 horas.

Grupo Ionomicina + Roscovitine com baixo cálcio:

Incubados em meio MEM hepes + 10% SFB + 5 $\mu$ M ionomicina por 8 minutos, lavados em MEM hepes + 10% SFB e incubados em meio MEM + 10% SFB + 66 $\mu$ M roscovitine + 5  $\mu$ g/ml citocalasina B por 5 horas.

Grupo Ionomicina + Estrôncio com baixo cálcio:

Incubados em meio MEM hepes + 10% SFB + 5 $\mu$ M ionomicina por 8 minutos, lavados em MEM hepes + 10% SFB e incubados em meio MEM + 10% SFB + 20mM cloreto de estrôncio (J T Baker, 4036-01) + 5  $\mu$ g/ml citocalasina B por 5 horas.

Grupo Ionomicina + 6 DMAP com baixo cálcio:

Incubados em meio MEM hepes + 10% SFB + 5 $\mu$ M ionomicina por 8 minutos, lavados em MEM hepes + 10% SFB e incubados em meio MEM + 10% SFB + 2mM 6 DMAP (Sigma, D2629) + 5  $\mu$ g/ml citocalasina B por 4 horas.

Grupo Ionomicina + Cicloheximide com alto Cálcio:

Incubados em meio MEM hepes + 0,84mg/ml  $\text{CaCl}_2$  (Sigma, C7902) + 10% SFB + 5 $\mu\text{M}$  ionomicina por 8 minutos, lavados em MEM hepes + 10% SFB e incubados em meio MEM + 0,42mg/ml  $\text{CaCl}_2$  + 10% SFB + 10 $\mu\text{g/ml}$  cicloheximide + 5  $\mu\text{g/ml}$  citocalasina B por 4 horas.

Grupo Ionomicina + Roscovitine com alto Cálcio:

Incubados em meio MEM hepes + 0,84mg/ml  $\text{CaCl}_2$  + 10% SFB + 5 $\mu\text{M}$  ionomicina por 8 minutos, lavados em MEM hepes + 10% SFB e incubados em meio MEM + 0,42mg/ml  $\text{CaCl}_2$  + 10% SFB + 66 $\mu\text{M}$  roscovitine + 5  $\mu\text{g/ml}$  citocalasina B por 5 horas.

Grupo Ionomicina + Estrôncio com alto Cálcio:

Incubados em meio MEM hepes + 0,84mg/ml  $\text{CaCl}_2$  + 10% SFB + 5 $\mu\text{M}$  ionomicina por 8 minutos, lavados em MEM hepes + 10% SFB e incubados em meio MEM + 0,42mg/ml  $\text{CaCl}_2$  + 10% SFB + 20mM cloreto de estrôncio + 5  $\mu\text{g/ml}$  citocalasina B por 5 horas.

Grupo Ionomicina + 6 DMAP com alto Cálcio:

Incubados em meio MEM hepes + 0,84mg/ml  $\text{CaCl}_2$  + 10% SFB + 5 $\mu\text{M}$  ionomicina por 8 minutos, lavados em MEM hepes + 10% SFB e incubados em meio MEM + 0,42mg/ml  $\text{CaCl}_2$  + 10% SFB + 2mM 6 DMAP+ 5  $\mu\text{g/ml}$  citocalasina B por 4 horas.

Após o período de ativação os ovócitos foram cultivados (10 $\mu\text{l}$  de meio para cada ovócito) em meio HTF:BME (1:1), 0,6% BSA + 10% SFB + 0,01% mioinositol (Sigma, I5125) + 75 $\mu\text{g/ml}$  gentamicina à 39°C em atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ , 5% de  $\text{O}_2$ , e 90% de  $\text{N}_2$  por 24 horas.

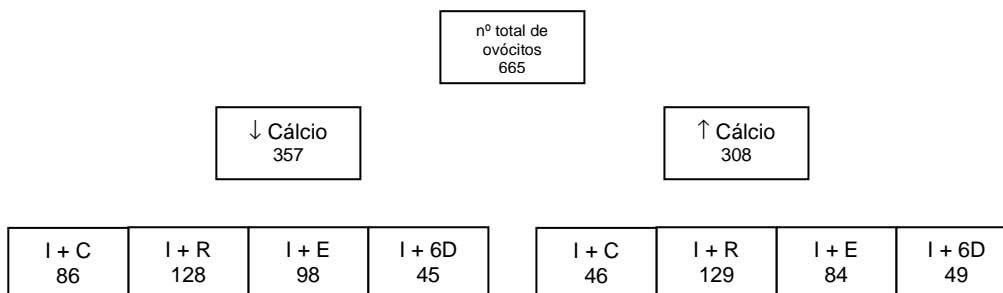


FIGURA 11 - Distribuição dos ovócitos bovinos nos grupos experimentais de ativação partenogenética para 24 horas de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; E: estrôncio; 6D: 6 DMAP).

A avaliação das taxas de ativação foi realizada por meio da transferência dos ovócitos, após o período de cultivo, para gotas de 10µl de Hoescht 33342 (7,5 µg/ml) em lâmina histológica, cobertos com lamínula e avaliados em microscópio invertido Leica- DMIRB luz UV filtro nº 2 (350 a 461 nm). Foram considerados ativados os ovócitos que apresentaram uma placa metafásica e dois corpúsculos polares, descondensação da cromatina indicando a formação de pró-núcleos, singamia, primeira figura mitótica ou clivados no momento da análise.

#### 4.2.2 Ativação partenogenética de ovócitos eqüinos

Após o período de maturação *in vitro*, os ovócitos foram desnudados, selecionados quanto ao citoplasma homogêneo e divididos entre os grupos de ativação partenogenética abaixo, respeitando a separação inicial entre ovócitos expandidos e compactos (Figura 12 e 13):

Grupo Ionomicina + Cicloheximide com baixo cálcio:

Incubados em meio MEM hepes+ 10% SFB + 5µM ionomicina por 8 minutos, lavados em MEM hepes+ 10% SFB e incubados em meio MEM + 10% SFB + 10µg/ml cicloheximide + 5 µg/ml citocalasina B por 4 horas.

Grupo Ionomicina + Roscovitine com baixo cálcio:

Incubados em meio MEM hepes + 10% SFB + 5 $\mu$ M ionomicina por 8 minutos, lavados em MEM hepes + 10% SFB e incubados em meio MEM + 10% SFB + 66 $\mu$ M roscovitine + 5  $\mu$ g/ml citocalasina B por 5 horas.

Grupo Ionomicina + 6 DMAP com baixo cálcio:

Incubados em meio MEM hepes + 10% SFB + 5 $\mu$ M ionomicina por 8 minutos, lavados em MEM hepes + 10% SFB e incubados em meio MEM + 10% SFB + 2mM 6 DMAP + 5  $\mu$ g/ml citocalasina B por 4 horas.

Grupo Ionomicina + Cicloheximide com alto Cálcio:

Incubados em meio MEM hepes + 0,84mg/ml CaCl<sub>2</sub> + 10% SFB + 5 $\mu$ M ionomicina por 8 minutos, lavados em MEM hepes + 10% SFB e incubados em meio MEM + 0,42mg/ml CaCl<sub>2</sub> + 10% SFB + 10 $\mu$ g/ml cicloheximide + 5  $\mu$ g/ml citocalasina B por 4 horas.

Grupo Ionomicina + Roscovitine com alto Cálcio:

Incubados em meio MEM hepes + 0,84mg/ml CaCl<sub>2</sub> + 10% SFB + 5 $\mu$ M ionomicina por 8 minutos, lavados em MEM hepes + 10% SFB e incubados em meio MEM + 0,42mg/ml CaCl<sub>2</sub> + 10% SFB + 66 $\mu$ M roscovitine + 5  $\mu$ g/ml citocalasina B por 5 horas.

Grupo Ionomicina + 6 DMAP com alto Cálcio:

Incubados em meio MEM hepes + 0,84mg/ml CaCl<sub>2</sub> + 10% SFB + 5 $\mu$ M ionomicina por 8 minutos, lavados em MEM hepes + 10% SFB e incubados em meio MEM + 0,42mg/ml CaCl<sub>2</sub> + 10% SFB + 2mM 6 DMAP+ 5  $\mu$ g/ml citocalasina B por 4 horas.

Após o período de ativação os ovócitos foram cultivados (10 $\mu$ l de meio para cada ovócito) em meio DMEM/F12 (Gibco 11320-033) + 10% SFB + 0,01% mioinositol + 75 $\mu$ g/ml gentamicina à 39°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, e 90% de N<sub>2</sub> por 24 horas ou até o dia 3 após ativação.

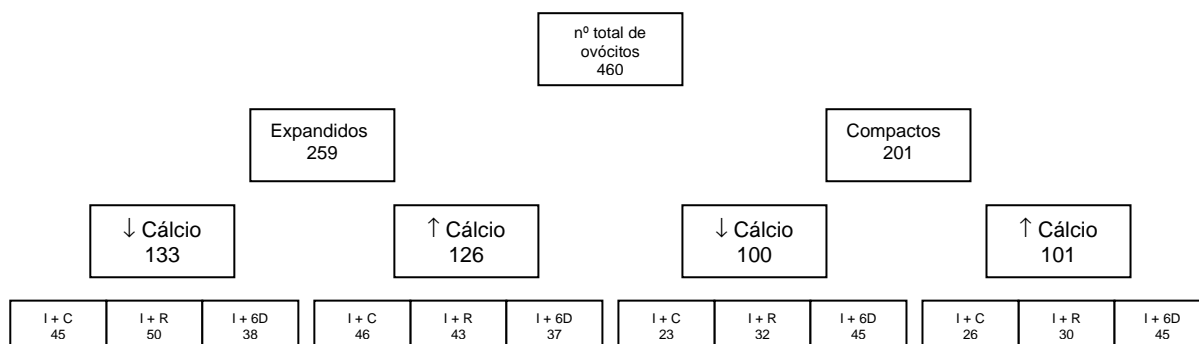


FIGURA 12 - Distribuição dos ovócitos eqüinos nos grupos experimentais de ativação partenogenética em 24 horas de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; 6D: 6 DMAP).

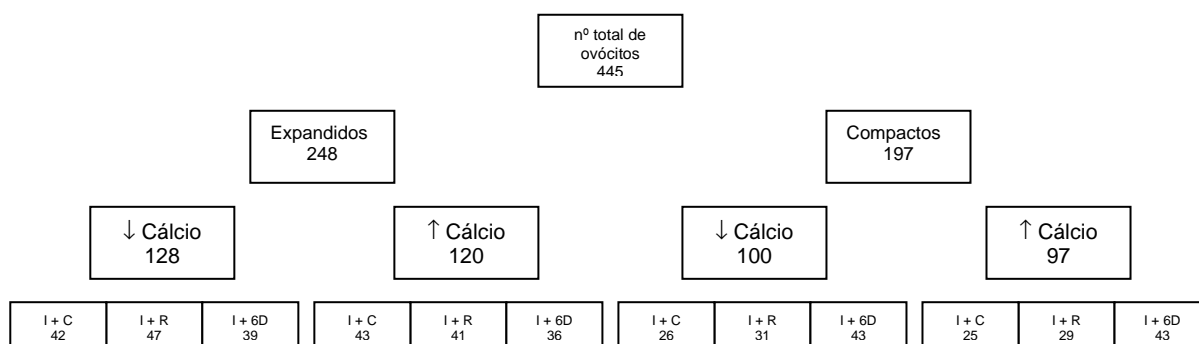


FIGURA 13 - Distribuição dos ovócitos eqüinos nos grupos experimentais de ativação partenogenética em três dias de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; 6D: 6 DMAP).

A avaliação das taxas de ativação foi realizada por meio da transferência dos ovócitos, após o período de cultivo, para gotas de 10µl de Hoescht 33342 (7,5 µg/ml) em lâmina histológica, cobertos com lamínula e avaliados em microscópio invertido Leica- DMIRB luz UV filtro nº 2 (350 a 461 nm). Foram considerados ativados os ovócitos que apresentaram uma placa metafásica e dois corpúsculos polares, descondensação da cromatina indicando a formação de pró-núcleos, singamia, primeira figura mitótica ou clivados no momento da análise.

## 4.5 Experimento V

### 4.5.1 Transferência Nuclear em Eqüinos

Foram utilizados na transferência nuclear ovócitos eqüinos maturados por 30 horas e ovócitos mantidos por 24 horas sob ação do roscovitine antes do período de maturação *in vitro*. Após as 30 horas de maturação *in vitro* os ovócitos eqüinos foram desnudados, e incubados por 30 minutos em meio MEM hepes acrescido de 10% SFB, 7,5 µg/ml Hoescht 33342, 5 µg/ml citocalasina B e 75µg/ml gentamicina. Após a incubação, os ovócitos foram lavados (MEM hepes acrescido 10% SFB e 75µg/ml gentamicina) e transferidos individualmente para as gotas de micromanipulação conforme demonstrado na figura 14 com 8 µl de volume (MEM hepes acrescido de 10% SFB, 5 µg/ml citocalasina B e 75µg/ml gentamicina) e 15 gotas em cada placa de micromanipulação recobertas com óleo mineral, onde foram micromanipulados 15 ovócitos por vez.

Após 20 minutos em que os ovócitos estavam sendo expostos ao meio com Hoescht 33342, iniciou-se a tripsinização dos fibroblastos em confluência cultivados nas placas de quatro poços (um poço para cada placa de micromanipulação) retirando todo meio de cultivo do poço, este foi lavado com solução de PBS, e adicionado de 100µl de Tripsina Versene à 36° C. A placa foi mantida em estufa a 38,5° C por no máximo três minutos, e até que todas as células se soltassem do fundo. Realizou-se então a neutralização com meio DMEM acrescido de 20% de SFB e Penicilina/Estreptomicina, na proporção 3:1 (meio:tripsina). Os fibroblastos resuspensos em meio DMEM, foram adicionados as gotas de micromanipulação para o uso na reconstituição.

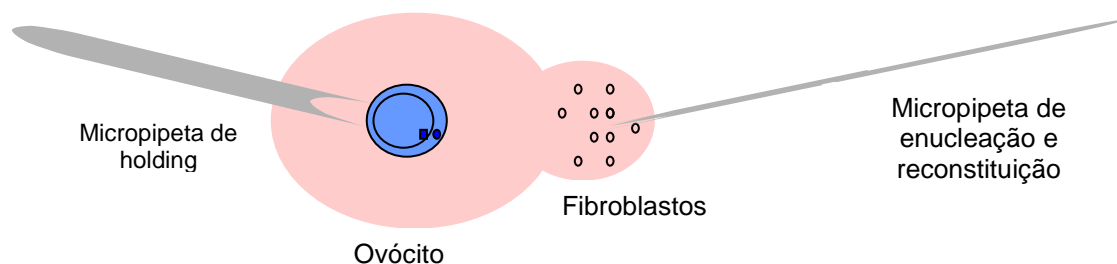


FIGURA 14 – Figura ilustrativa demonstrando a montagem das gotas de micromanipulação.

A enucleação dos ovócitos foi realizada entre 32 e 34 horas após o início da maturação *in vitro*, em microscópio óptico invertido (Nikon, Elipse TS 100), micromanipulador (Sutter, seringas Narishige) (Figura 15 A e B). A avaliação do estágio de maturação nuclear foi realizada durante o procedimento e procurou-se posicionar o material nuclear entre 3 e 6 horas para que fossem removidos o primeiro corpúsculo polar e porção de citoplasma adjacente contendo a placa metafásica, tomando o cuidado de aspirar o mínimo de volume possível. No procedimento foram utilizadas micropipetas de vidro com diâmetro interno de 20 $\mu$ m e bisel afiado para a enucleação e reconstituição e micropipetas de Holding (40 e 135 $\mu$ m de diâmetro interno e externo, respectivamente) para a fixação dos ovócitos durante o procedimento (Eppendorf<sup>®</sup>).



FIGURA 15 (A) - Preparação do micromanipulador para os procedimentos de enucleação; (B) – Placa de micromanipulação.

A enucleação foi confirmada expondo-se somente o carioplasto e o primeiro corpúsculo polar, ainda no interior da micropipeta, à luz ultravioleta para verificação da presença ou ausência da placa metafásica. Logo após a enucleação, mantendo o ovócito posicionado na micropipeta de holding, foi selecionado um fibroblasto de diâmetro entre 13 a 15 $\mu\text{m}$ , em uma população celular com 11 a 23 $\mu\text{m}$  de diâmetro (HINRICHS et al., 2006b), apresentando contorno regular da membrana citoplasmática, aspirado individualmente para o interior da micropipeta de injeção, e inserido diretamente no interior do citoplasto receptor (Figura 16 A a D). Hinrichs e colaboradores em 2006b reportaram que 95 a 98% das células de menor tamanho apresentam-se em G0/G1 durante o tratamento.

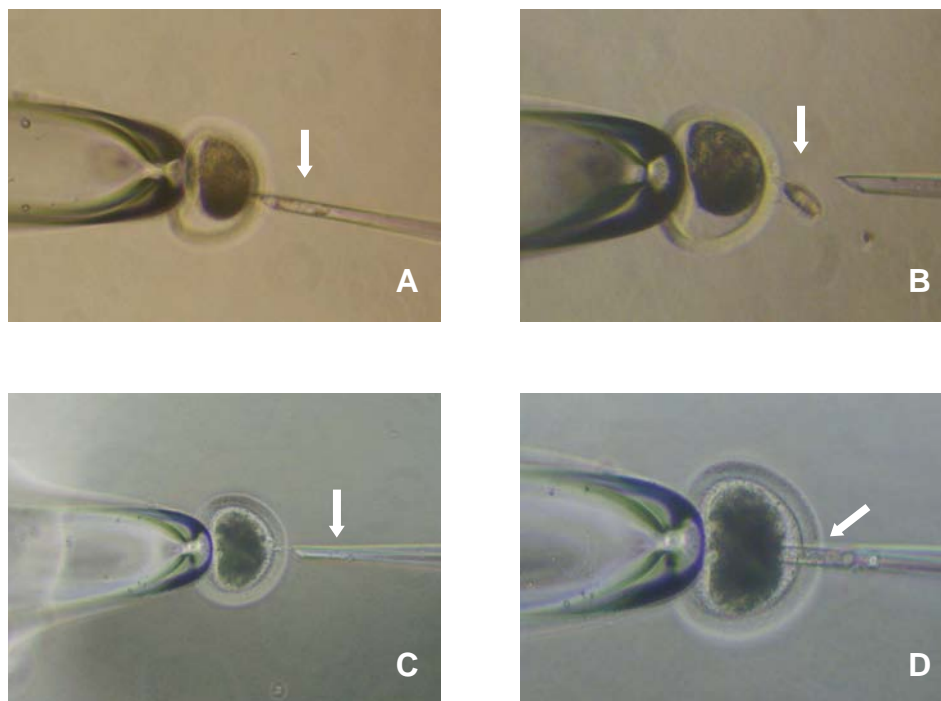


FIGURA 16 – (A) Enucleação ovocitária com a retirada do corpúsculo polar do espaço perivitelínico e da placa metafásica junto ao oolema (seta); (B) o material nuclear das duas estruturas é dispensado na gota (seta); (C) o fibroblasto é colocado próximo ao bisel da agulha (seta); (D) injeção do fibroblasto (seta) (microscópio invertido, aumento de 400x).

Os ovócitos em metáfase I e II enucleados e reconstituídos com êxito foram removidos da placa de micromanipulação lavados em meio MEM hepes acrescido de 10% SFB e 75µg/ml gentamicina e incubados por uma hora, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, e 90% de N<sub>2</sub>, até o momento da ativação artificial. A ativação artificial foi realizada utilizando os meios com Ionomicina + Roscovitine e Ionomicina + 6 DMAP (Figura 17) como descrito anteriormente.

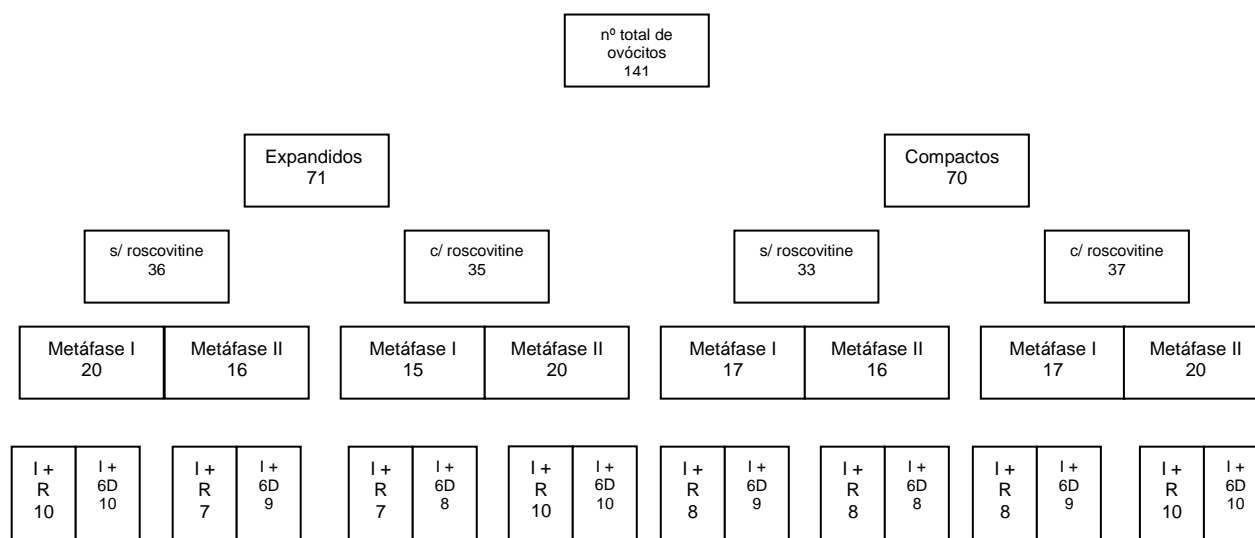


FIGURA 17 - Distribuição dos ovócitos eqüinos nos grupos experimentais de ativação artificial após TN (I: ionomicina; R: roscovitine; 6D: 6 DMAP).

Após o período de ativação os ovócitos foram cultivados (10µl de meio para cada ovócito) em meio DMEM/F12 + 10% SFB + 0,01% mioinositol + 75µg/ml gentamicina à 39°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, e 90% de N<sub>2</sub> por 3 dias.

A avaliação das taxas de ativação/formação de núcleo em descondensação foram realizadas por meio da transferência dos ovócitos, após o período de cultivo, para gotas de 10µl de Hoescht 33342 em lâmina histológica, cobertos com lamínula e avaliados em microscópio invertido Leica-DMIRB luz UV filtro nº 2 (350 a 461 nm).

#### 4.6 Metodologias Estatísticas

No experimento I, foi utilizado o teste de Friedman, ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  para comparar os momentos em relação a todas as variáveis em estudo e o teste para comparações múltiplas pois os pré-requisitos para a utilização de testes paramétricos não foram atendidos, ou seja, com base na amostra, a hipótese de que as variáveis em estudo seguem distribuição normal foi rejeitada ou houve diferença significativa entre os grupos definidos pelos momentos em relação a variância (heterocedasticidade).

No experimento II, foram utilizados o teste exato de Fisher ou o teste Z de proporções, ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  para comparar os grupos expandidos e compactos após 30 horas de maturação *in vitro* em relação à proporção de ovócitos eqüinos degenerados.

Na fase I do experimento III, foi ajustado um modelo de regressão linear logística para explicar o percentual de ovócitos com protrusão da placa metafásica em função da dose de demecolcina. Na fase II, foi utilizado o Teste Z de proporções, ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  para comparar as espécies bovina e eqüina em relação ao percentual de protrusão da placa metafásica.

No experimento IV, foi utilizado o teste Z para proporções ou o teste exato de Fisher, ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  para estudar o efeito dos protocolos de ativação artificial em ovócitos bovinos e eqüinos.

No experimento V, foi utilizada a técnica de Análise de *Deviance* para selecionar o melhor modelo de regressão logística que explicasse o percentual de ovócitos eqüinos com formação do núcleo descondensado após a transferência nuclear.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Experimento I

#### 5.1.1 Sincronização do ciclo celular de fibroblastos eqüinos de animais adultos

##### 5.1.1.1 Integridade de membrana

Os resultados da avaliação da integridade de membrana estão expressos na tabela 1 para células viáveis e para células com a membrana lesada. Não houve diferença significativa entre os grupos de privação de soro fetal bovino e confluência de fibroblastos eqüinos doadores de núcleo para a transferência nuclear.

TABELA 1 - Índice de integridade de membrana pós-descongelação de fibroblastos eqüinos doadores de núcleo para a transferência nuclear em dois protocolos de sincronização do ciclo celular.

Momento	Mediana da integridade de membrana	Mediana da lesão de membrana
24 horas	94,0 %	6,0%
48 horas	87,0 %	13,0%
72 horas	91,5 %	8,5%
96 horas	94,0 %	6,0%
120 horas	95,0 %	5,0%
144 horas	92,0 %	8,0%
168 horas	91,5 %	8,5%
Confluência	93,0 %	7,0%

Teste de Friedman seguido do Teste para comparações múltiplas (P = 0,661)

### 5.1.1.2 Ciclo celular

Os resultados da avaliação do ciclo celular (G0/G1) nos diferentes momentos após descongelação estão expressos na tabela 2. Houve diferença significativa entre os momentos 24 horas e confluência que apresentaram uma porcentagem de células em G0/G1 inferiores aos demais. Após as 24 horas de cultivo sob privação de soro fetal bovino, as porcentagens de células em G0/G1 se mantiveram constantes. Os resultados demonstraram também que os melhores momentos para a utilização das células doadoras de núcleo foram 72, 96 e 168 horas após o início da privação de soro fetal bovino à 0,5%.

TABELA 2 - Índice de sincronização do ciclo celular (G0/G1) pós-descongelação de fibroblastos eqüinos doadores de núcleo para a transferência nuclear em dois protocolos de sincronização do ciclo celular.

Momento	Mediana
24 horas	75,2% <sup>c</sup>
48 horas	94,1% <sup>b</sup>
72 horas	97,3% <sup>a</sup>
Privação SFB 96 horas	98,7% <sup>a</sup>
120 horas	85,8% <sup>b</sup>
144 horas	94,7% <sup>b</sup>
168 horas	97,9% <sup>a</sup>
Confluência	69,6% <sup>c</sup>

Teste de Friedman seguido do Teste para comparações múltiplas (P = <0,001)

a, b, c - Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa.

## **5.2 Experimento II**

### **5.2.1 Colheita, seleção e classificação de ovócitos eqüinos**

Foram realizadas 20 viagens ao matadouro com uma média de 60,3 ovários coletados por viagem, totalizando 1206 ovários. Destes, 201 foram descartados pela ausência de folículos entre 10 a 30 mm. Dos ovários utilizados, 3568 folículos foram curetados, uma média de 3,55 folículos por ovário. A taxa de recuperação média foi de 2,22 ovócitos/ovário e 0,62 ovócitos/folículo. No total foram obtidos 2232 CCO, destes 101 foram descartados pela baixa qualidade (desnudados ou fragmentados), 1170 (54,90%) foram classificados como expandidos e 961 (45,10%) como compactos. Durante as manipulações foram perdidos 53 CCO expandidos e 43 compactos.

### **5.2.2 Uso do roscovitine na maturação nuclear de ovócitos eqüinos**

Na análise dos grupos de CCO classificados como expandidos e compactos em relação aos estágios de maturação nuclear dos ovócitos eqüinos imediatamente após a colheita, observou-se que não houve diferença significativa no percentual relativo de ovócitos nas diferentes configurações cromossômicas (Figura 18).

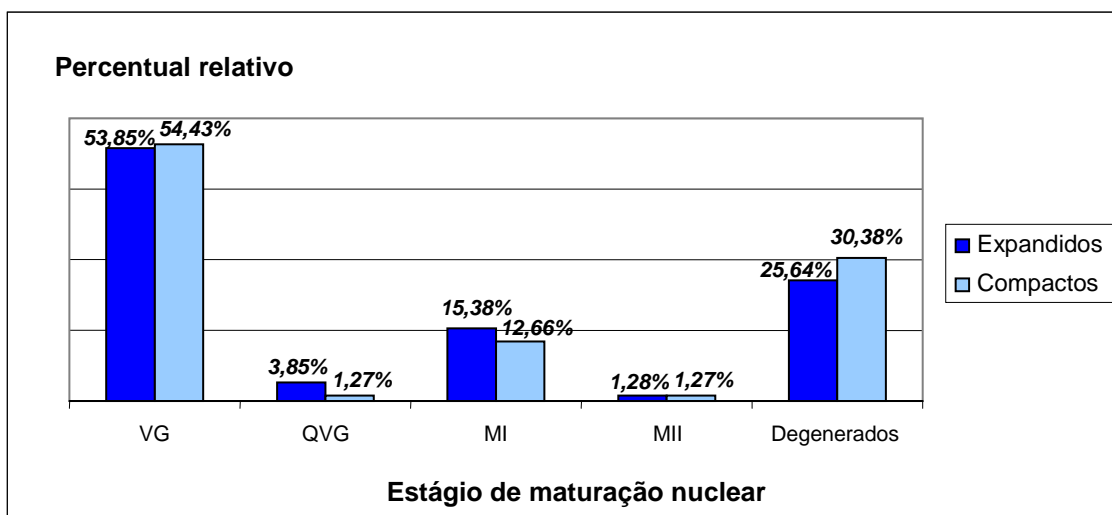


FIGURA 18 – Estágio de maturação nuclear de CCO eqüinos compactos e expandidos após a colheita (Teste exato de Fisher,  $p=0,851$ ).

Na análise dos grupos de CCO classificados como expandidos (Figura 20 A) e compactos (Figura 20 B) para dos estágios de maturação nuclear dos ovócitos eqüinos incubados em roscovitine por 24 horas, observou-se que não houve diferença significativa no percentual relativo de ovócitos nas diferentes configurações cromossômicas (Figura 19).

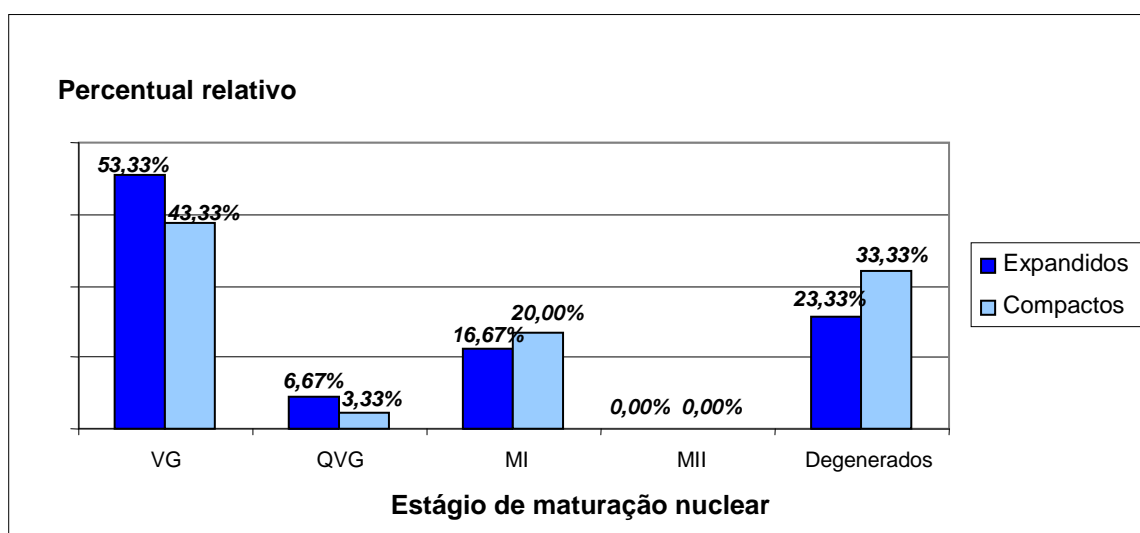


FIGURA 19 - Estágio de maturação nuclear de CCO eqüinos compactos e expandidos após a exposição ao roscovitine por 24 horas (Teste exato de Fisher,  $p=0,761$ ).

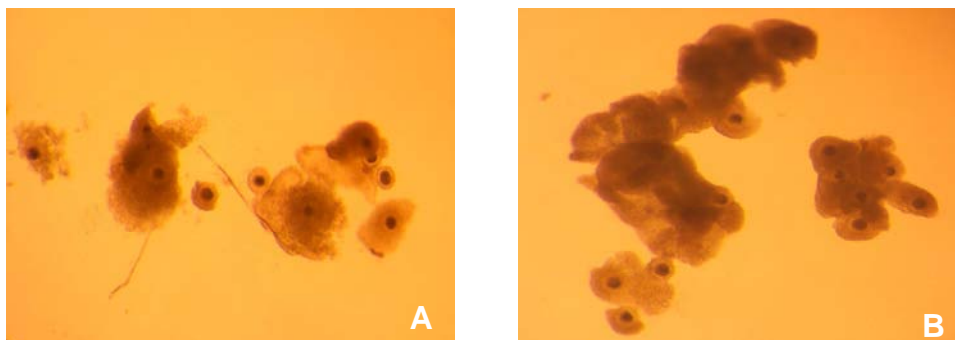


FIGURA 20 – Aspecto dos (A) CCO eqüinos expandidos após 24 horas de incubação em roscovitine; (B) CCO eqüinos compactos após 24 horas de incubação em roscovitine; (microscópio estereoscópico, aumento de 40x).

Na análise dos estágios de maturação nuclear dos CCO eqüinos imaturos e expandidos expostos ou não ao roscovitine, observou-se que não houve diferença significativa no percentual relativo de ovócitos nas diferentes configurações cromossômicas para os dois tratamentos (Figura 21).

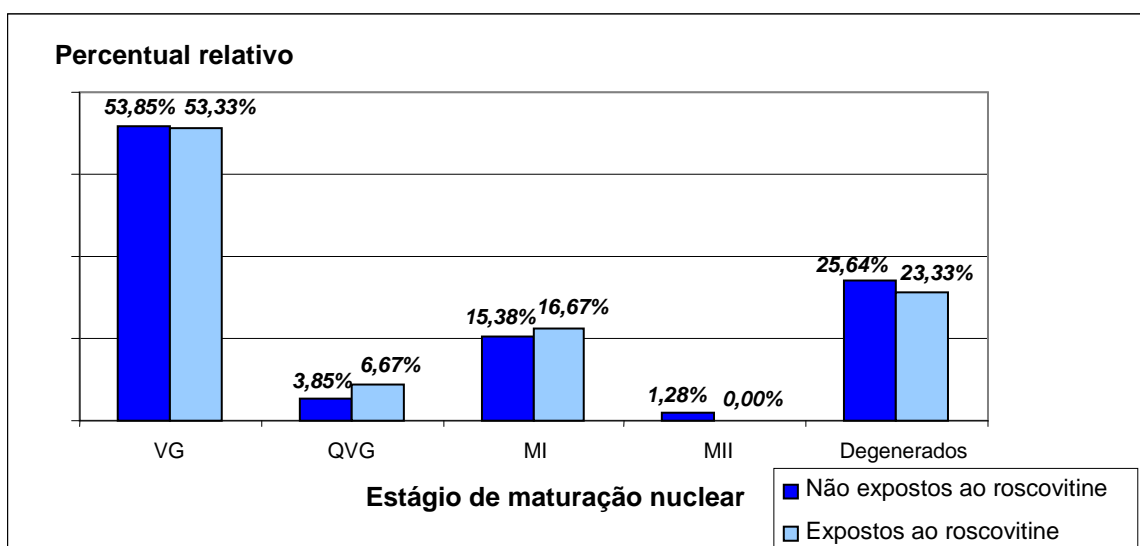


FIGURA 21 – Comparação das taxas de maturação nuclear de CCO eqüinos expandidos de acordo com a exposição ou não ao roscovitine por 24 horas após a colheita (Teste exato de Fisher,  $p=0,942$ ).

Na análise dos estágios de maturação nuclear dos CCO eqüinos imaturos e compactos expostos ou não ao roscovitine, observou-se que não houve diferença significativa no percentual relativo de ovócitos nas diferentes configurações cromossômicas para os dois tratamentos (Figura 22).

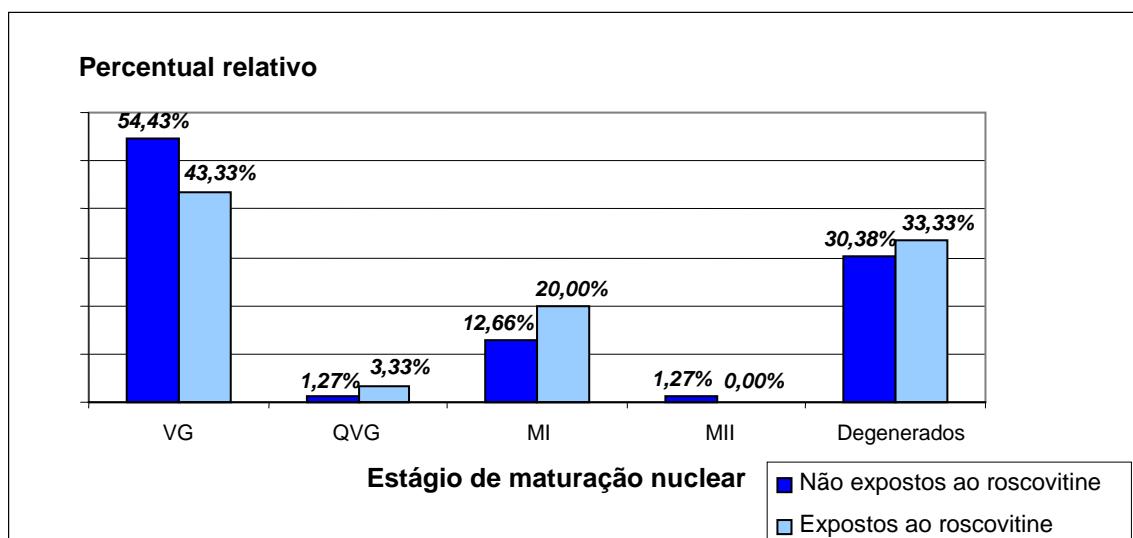


FIGURA 22 – Comparação das taxas de maturação nuclear de CCO eqüinos compactos de acordo com a exposição ou não ao roscovitine por 24 horas após a colheita (Teste exato de Fisher,  $p=0,601$ ).

Na análise dos grupos de CCO classificados como expandidos (Figura 24 A) e compactos (Figura 24 B) para os estágios de maturação nuclear após 30 horas de maturação *in vitro*, observou-se diferença significativa no percentual relativo de ovócitos nas diferentes configurações cromossômicas. O grupo de ovócitos classificados como degenerados diferiu estatisticamente em relação aos demais ( $p=0,009$ ). Na comparação entre os CCO expandidos e compactos em degeneração após o período de cultivo também houve diferença significativa significativa ( $p=0,002$ ) indicando uma maior proporção de CCO compactos degenerados quando comparados aos expandidos (Figura 23).

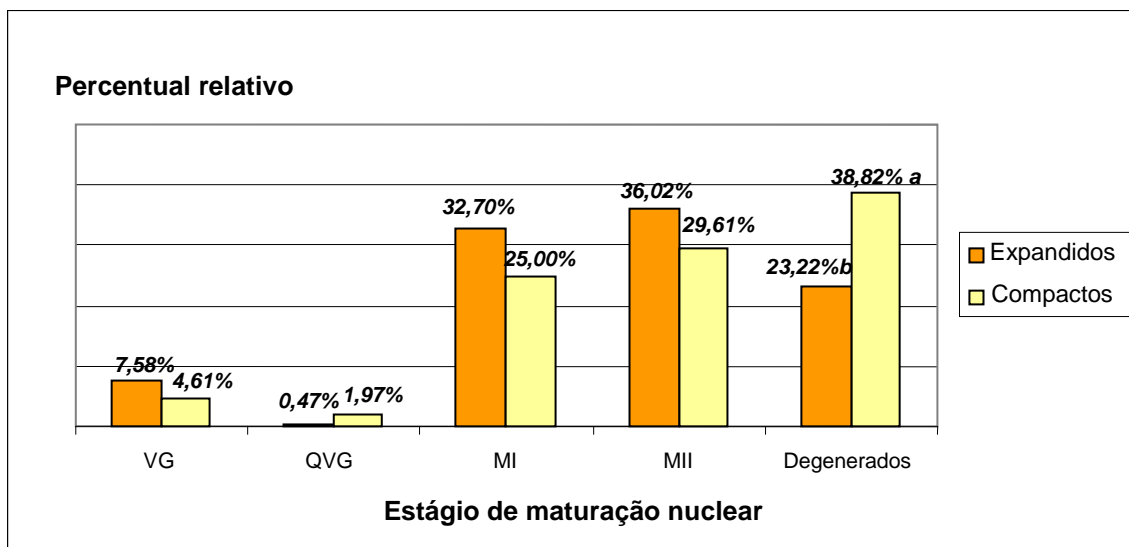


FIGURA 23 - Estágio de maturação nuclear de CCO eqüinos compactos e expandidos após 30 horas de maturação *in vitro* (Teste exato de Fisher,  $p=0,009$  e para comparar as proporções de degenerados Teste Z de proporções,  $p=0,002$ ; a, b - letras diferentes sobre as colunas indicam diferença significativa).

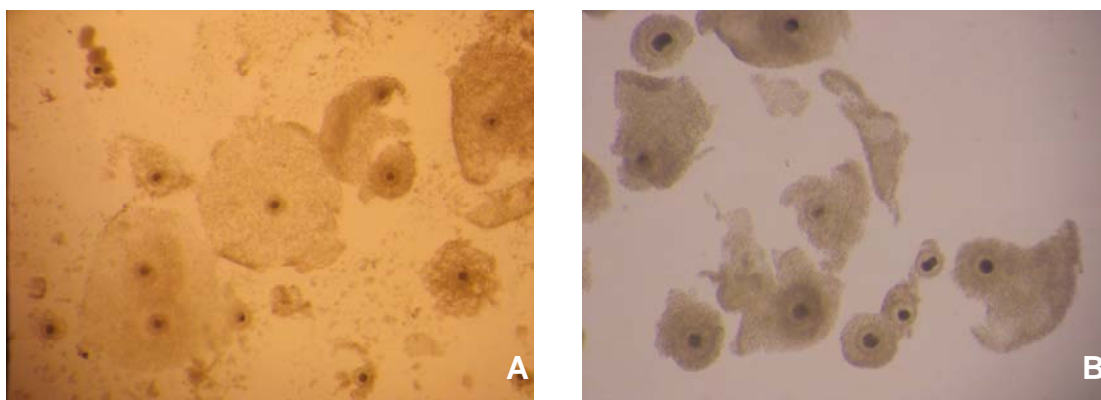


FIGURA 24 – Aspecto de expansão das células do *cumulus* de CCO eqüinos expandidos (A) e compactos (B) após 30 horas de maturação *in vitro* (microscópio estereoscópico, aumento de 40x).

Na análise dos grupos de CCO classificados como expandidos (Figura 26 A) e compactos (Figura 26 B) para os estágios de maturação nuclear dos ovócitos eqüinos incubados previamente em roscovitine por 24 horas antes da maturação *in vitro* por 30 horas, observou-se que não houve diferença significativa no percentual relativo de ovócitos nas diferentes configurações cromossômicas (Figura 25).

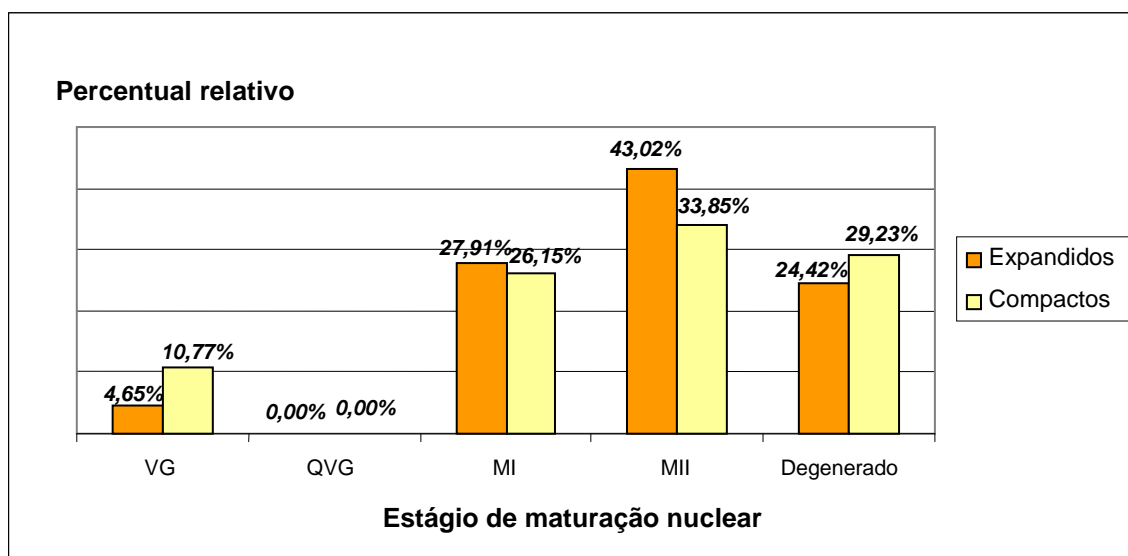


FIGURA 25 - Estágio de maturação nuclear de CCO eqüinos compactos e expandidos após a exposição ao roscovitine por 24 horas e 30 horas de maturação *in vitro* (Teste exato de Fisher,  $p=0,387$ ).

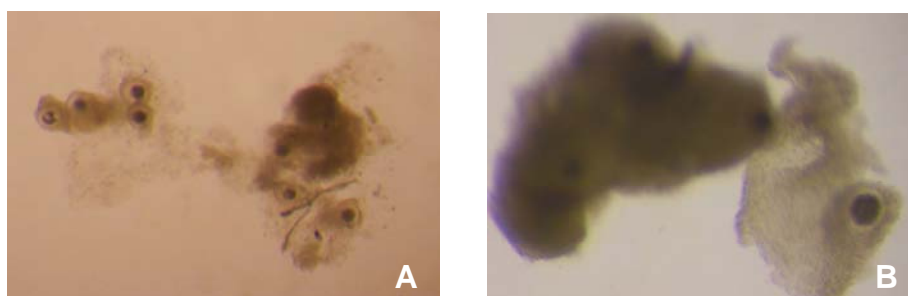


FIGURA 26 – Aspecto dos CCO eqüinos expandidos (A) e compactos (B) após 24 horas de incubação em roscovitine e 30 horas de maturação *in vitro* (microscópio estereoscópico, aumento de 40x para A e 80x para B).

Na análise dos estágios de maturação nuclear dos CCO eqüinos expandidos e expostos ou não ao roscovitine antes da maturação *in vitro*, observou-se que não houve diferença significativa no percentual relativo de ovócitos nas diferentes configurações cromossômicas para os dois tratamentos (Figura 27).

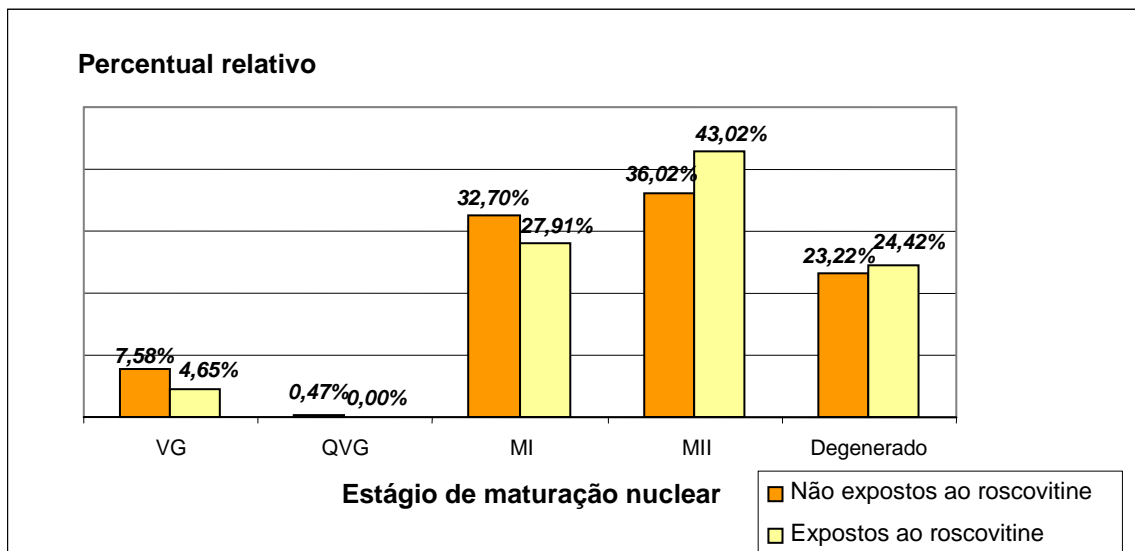


FIGURA 27 – Comparação das taxas de maturação nuclear de CCO eqüinos expandidos de acordo com a exposição ou não ao roscovitine por 24 horas antes da maturação *in vitro* (Teste exato de Fisher,  $p=0,714$ ).

Na análise dos estágios de maturação nuclear dos CCO eqüinos compactos e expostos ou não ao roscovitine antes da maturação *in vitro*, observou-se que não houve diferença significativa no percentual relativo de ovócitos nas diferentes configurações cromossômicas para os dois tratamentos (Figura 28).

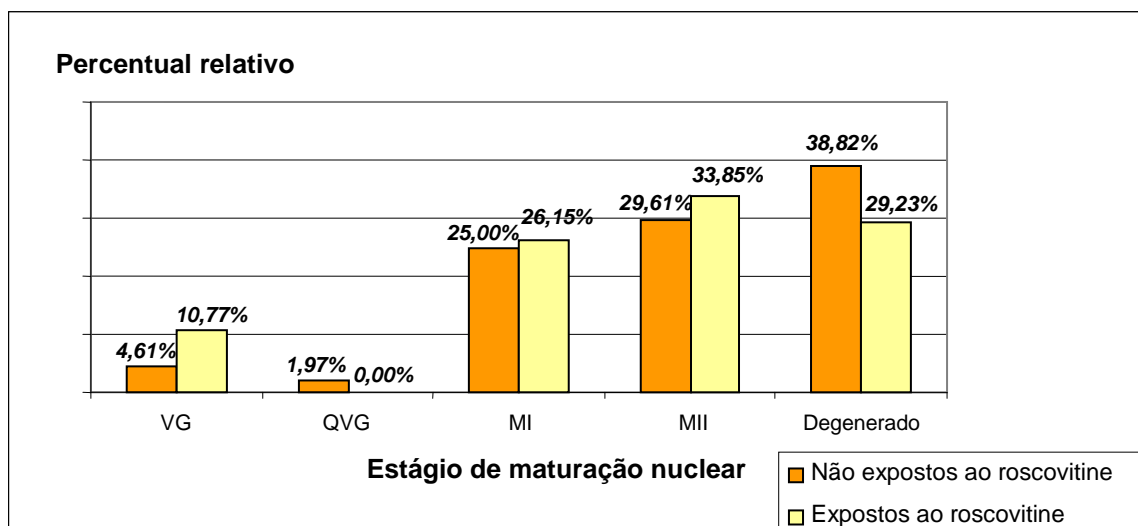


FIGURA 28 – Comparação das taxas de maturação nuclear de CCO eqüinos compactos de acordo com a exposição ou não ao roscovitine por 24 horas antes da maturação *in vitro* (Teste exato de Fisher,  $p = 0,275$ ).

### 5.3 Experimento III

#### 5.3.1 Colheita seleção e maturação *in vitro* de ovócitos bovinos

Foram realizadas 10 viagens ao matadouro com uma média de 26 ovários coletados por viagem. A taxa de recuperação média de ovócitos grau I por ovário foi de 3,21, sendo que no total foram obtidos 837 ovócitos para a realização do experimento III e destes 43 perdidos durante as manipulações.

#### 5.3.2 Enucleação Química de Ovócitos Eqüinos e Bovinos

##### 5.3.2.1 Fase I

Não houve diferença significativa ( $p = 0,141$ ) na análise das porcentagens de ovócitos eqüinos que responderam as diferentes concentrações de demecolcina com a protrusão da placa metafásica para o espaço perivitelínico (Figura 29, Tabela 3).

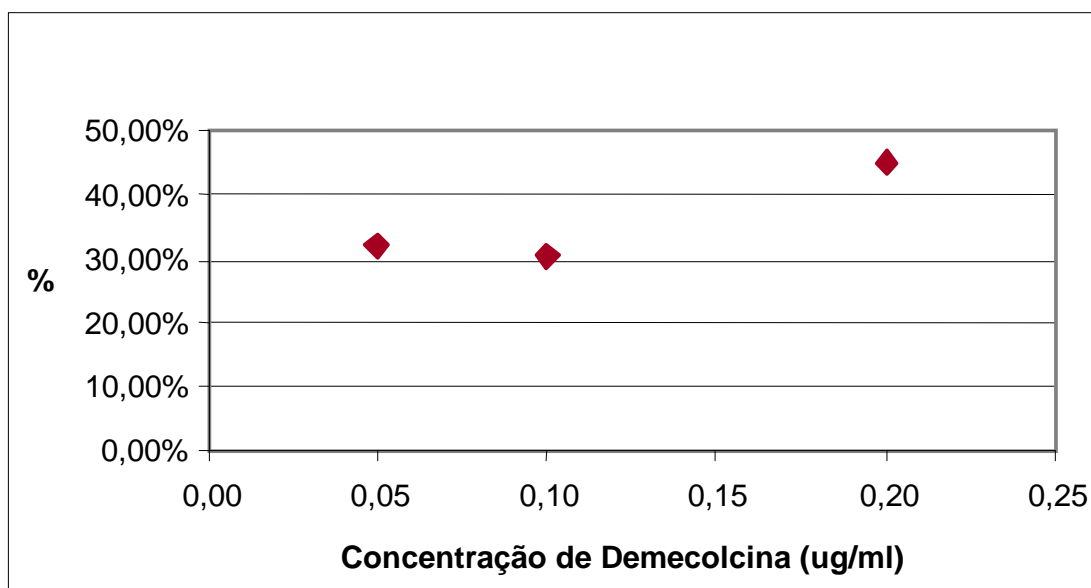


FIGURA 29 – Gráfico de dispersão entre percentual de ovócitos eqüinos com formação de protrusão do material nuclear após 30 horas de maturação *in vitro* em três doses de demecolcina (0,05µg/ml; 0,1µg/ml e 0,2µg/ml).

TABELA 3 - Ajuste do modelo logístico que explica o percentual de ovócitos com formação de protrusão do material nuclear no espaço perivitelinico, em relação à dose de demecolcina.

Coeficiente	Estimativa	Erro-padrão	p
Intercepto	-0,65	0,22	0,003
Dose de demecolcina	2,45	1,67	0,141

Deviance do modelo nulo = 2,624 com 2 graus de liberdade

Deviance Residual do modelo com efeito da dose = 0,447 com 1 grau de liberdade

### 5.3.2.2 Fase II

Não houve diferença significativa na análise das porcentagens de ovócitos que apresentaram protrusão da placa metafásica no espaço perivitelinico após a exposição a demecolcina nas concentrações de 0,05µg/ml para ovócitos bovinos (Figura 31 A e B) e 0,2µg/ml para ovócitos eqüinos (Figura 32 A a D) com *cumulus* compactos e expandidos (Figura 30, Tabela 4).

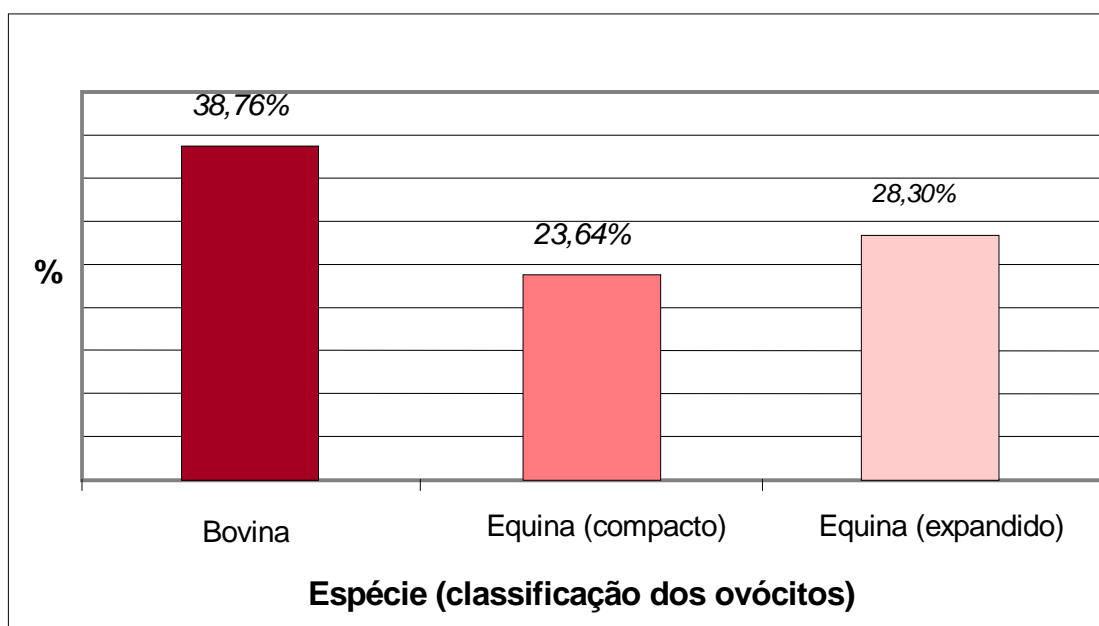


FIGURA 30 – Formação de protrusão em ovócitos bovinos e em eqüinos com *cumulus* compacto e expandido expostos a demecolcina nas concentrações de 0,05 $\mu$ g/ml e 0,2 $\mu$ g/ml, respectivamente, após 19 e 30 horas de maturação *in vitro*.

TABELA 4 - Comparações entre espécies em relação ao percentual de protusão da placa metafásica de ovócitos submetidos ao tratamento com demecolcina nas concentrações de 0,05 $\mu$ g/ml (bovina) e 0,2 $\mu$ g/ml (eqüina) após 19 e 30 horas de maturação *in vitro* respectivamente.

Comparações	p <sup>(*)</sup>
Bovina x Eqüina (compacto)	0,070
Bovina x Eqüina (expandido)	0,243
Eqüina (compacto) x Eqüina (expandido)	0,738

(\*) Teste Z para proporções ( $\alpha = 0,05$ )

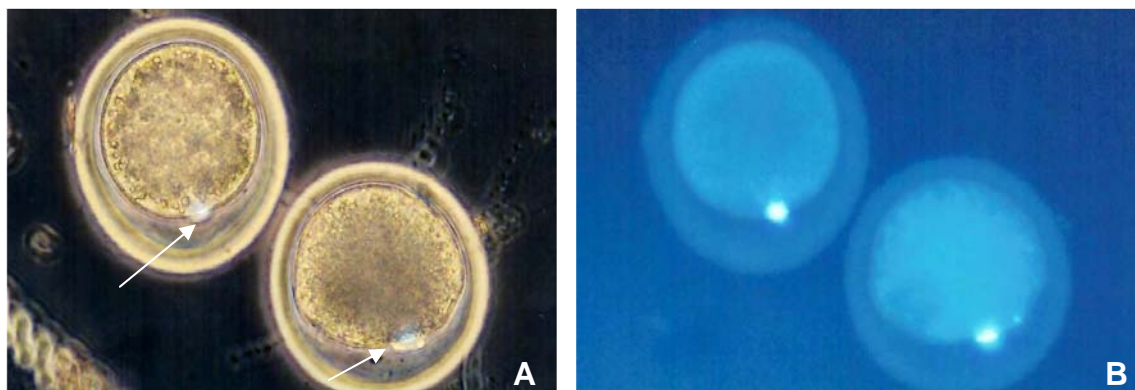


FIGURA 31 - Ovócitos bovinos tratados com demecolcina (A e B) ovócito com formação de protrusão na região cortical (indicada pela seta), contendo todo o material nuclear (microscópio invertido, aumento de 400x).

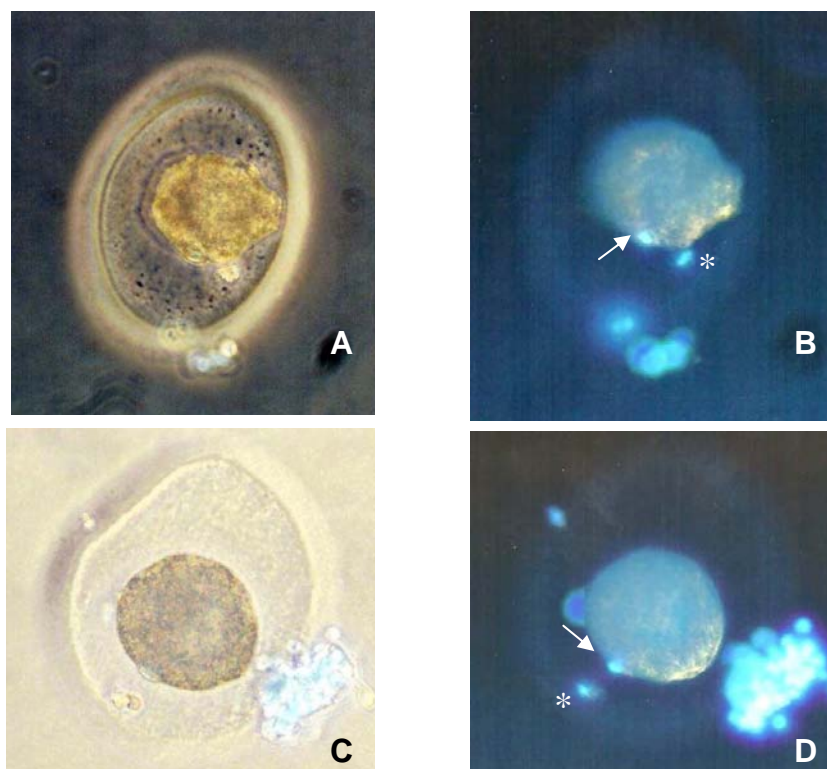


FIGURA 32 - Ovócitos eqüinos tratados com demecolcina (A a D) ovócitos com formação de protrusão na região cortical (indicada pela seta), e corpúsculo polar (indicado pelo \*) (microscópio invertido, aumento de 400x).

## **5.4 Experimento IV**

### **5.4.1 Ativação partenogenética de ovócitos bovinos**

Na análise dos grupos de ativação partenogenética de ovócitos bovinos (Figuras 34 A a D e 35 A e B) foram observadas diferenças significativas entre os quatro protocolos de ativação artificial quando analisados em relação a concentração de cálcio e também na análise entre as concentrações de cálcio de acordo com o protocolo. Para os ovócitos ativados em alta concentração de cálcio, os protocolos com ionomicina acrescida de cicloheximide e roscovitine foram superiores ao ionomicina + estrôncio e não diferiram estatisticamente do grupo ionomicina + 6 DMAP (Tabela 5). Para os ovócitos ativados em baixa concentração de cálcio, os protocolos com ionomicina acrescida de roscovitine e 6 DMAP foram superiores ao ionomicina + estrôncio e não diferiram estatisticamente do grupo ionomicina + cicloheximide. Quando os ovócitos foram analisados dentro do mesmo protocolo de ativação artificial comparando as duas concentrações de cálcio, foram obtidas diferenças significativas somente nos grupos ionomicina acrescida de cicloheximide ( $p=0,001$ ) e estrôncio ( $p=0,002$ ), sendo que para estes protocolos, as altas concentrações de cálcio pareceram benéficas ao desenvolvimento (Tabela 7, Figura 33).

TABELA 5 - Percentual de descondensação da cromatina obtida 24 horas após a ativação partenogenética de ovócitos bovinos utilizando-se quatro protocolos de ativação artificial e duas concentrações de cálcio no meio de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; E: estrôncio; 6 D: 6 DMAP).

Concentração de cálcio	Protocolo de ativação			
	I + C	I + R	I + E	I + 6 D
Alta	65,12% a <sup>(1)</sup>	60,16% a	40,82% b	48,89% ab
Baixa	34,78% ab	48,84% a	19,05% b	40,82% a
p <sup>(2)</sup>	0,001	0,089	0,002	0,562

<sup>(1)</sup> Letras iguais representam não diferença significativa, ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  entre os quatro protocolos sob determinada concentração de cálcio pela estatística teste Z para duas proporções.

<sup>(2)</sup> Comparação, ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  entre as concentrações de cálcio sob determinado protocolo pelo teste Z para duas proporções.

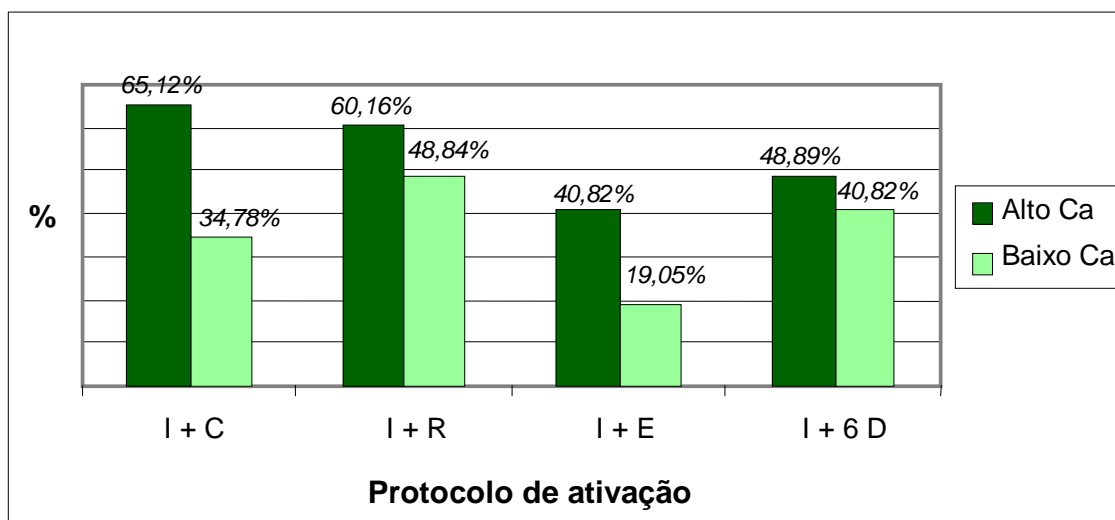


FIGURA 33 - Percentual de descondensação da cromatina obtida às 24 horas a partir da ativação partenogenética de ovócitos bovinos utilizando-se quatro protocolos de ativação artificial e duas concentrações de cálcio no meio de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; E: estrôncio; 6 D: 6 DMAP).

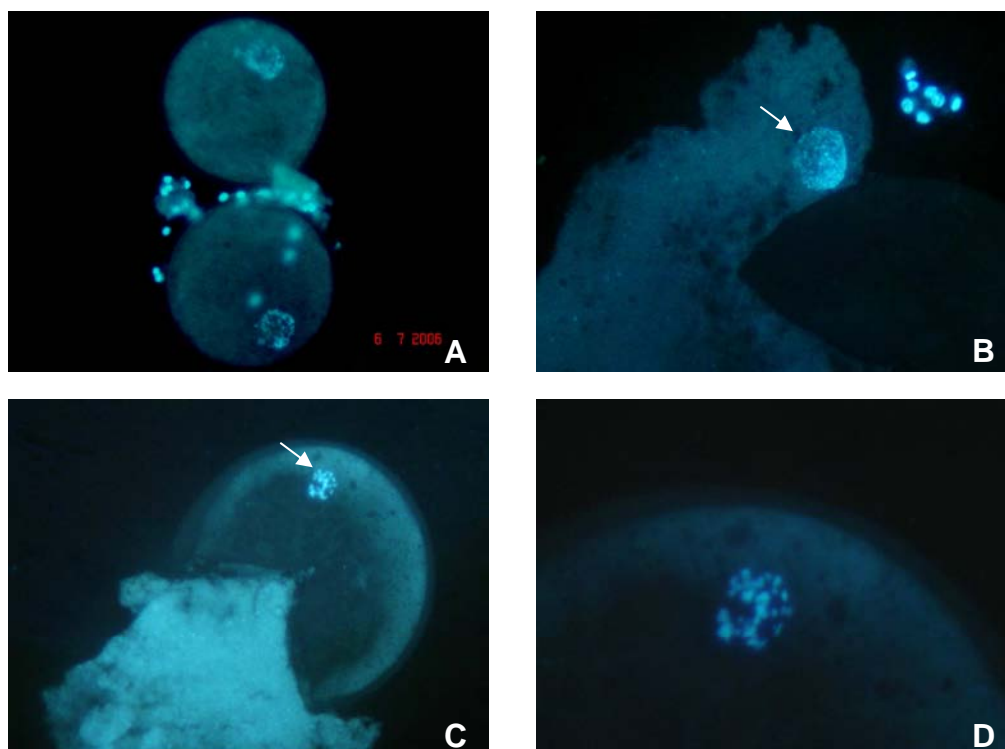


FIGURA 34 –Ovócitos bovinos ativados, (A) Dois ovócitos ativados (microscópio invertido, aumento de 400x); (B) Aspecto do núcleo descondensado após ativação (seta, microscópio invertido, aumento de 800x); (C) Núcleo iniciando condensação para formar primeira figura mitótica (seta, microscópio invertido, aumento de 400x); (D) Ampliação do núcleo da figura (C) (microscópio invertido, aumento de 800x).

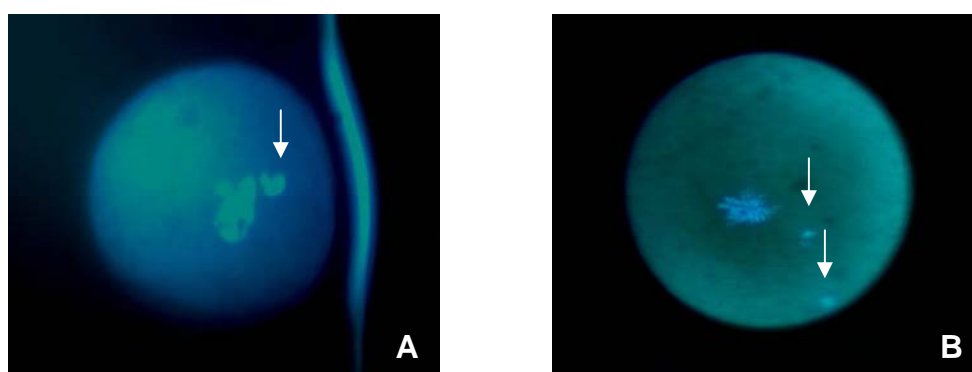


FIGURA 35 – Ovócitos bovinos ativados, (A): Formação de núcleo em descondensação e presença de um corpúsculo polar; (B): Figura mitótica da primeira divisão com dois corpúsculos polares, (microscópio invertido, aumento 400x). (seta: corpúsculo polar).

### 5.4.2 Ativação partenogenética de ovócitos eqüinos

Na análise dos grupos de ativação partenogenética de ovócitos eqüinos com *cumulus* compactos e expandidos (Figuras 37 A e B e 38) após 24 horas de cultivo, foram obtidas diferenças significativas entre os três protocolos de ativação artificial quando analisados sob determinada concentração de cálcio. Para os CCO expandidos ativados em alta concentração de cálcio, o protocolo ionomicina + 6 DMAP foi superior ao ionomicina acrescida de cicloheximide e roscovitine. Para os CCO expandidos ativados em baixa concentração de cálcio, o protocolo com ionomicina acrescida de 6 DMAP foi superior ao ionomicina + cicloheximide e não diferiu estatisticamente do grupo ionomicina + roscovitine. (Tabela 6, Figura 36).

TABELA 6 - Percentual de descondensação da cromatina obtida às 24 horas de cultivo, após a ativação partenogenética de ovócitos eqüinos utilizando-se três protocolos de ativação artificial e duas concentrações de cálcio (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; 6 D: 6 DMAP).

Classificação do ovócito	Concentração de cálcio	Protocolo de ativação		
		I + C	I + R	I + 6 D
Compacto	Alta	23,08% a <sup>(1)</sup>	33,33% a	37,78% a
	Baixa	8,70% a	21,88% a	26,67% a
	p <sup>(2)</sup>	0,254	0,397	0,367
Expandido	Alta	17,39% b	16,28% b	59,46% a
	Baixa	17,78% b	26,00% ab	44,74% a
	p <sup>(3)</sup>	1,000	0,376	0,296

<sup>(1)</sup> Letras iguais representam não diferença significativa, ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  entre três protocolos sob determinada concentração de cálcio pela estatística teste Z para duas proporções.

<sup>(2)</sup> Comparação, ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  entre as concentrações de cálcio sob determinado protocolo entre ovócitos compactos pelo teste exato de Fisher.

<sup>(3)</sup> Comparação, ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  entre as concentrações de cálcio sob determinado protocolo entre ovócitos expandidos pelo teste Z para duas proporções.

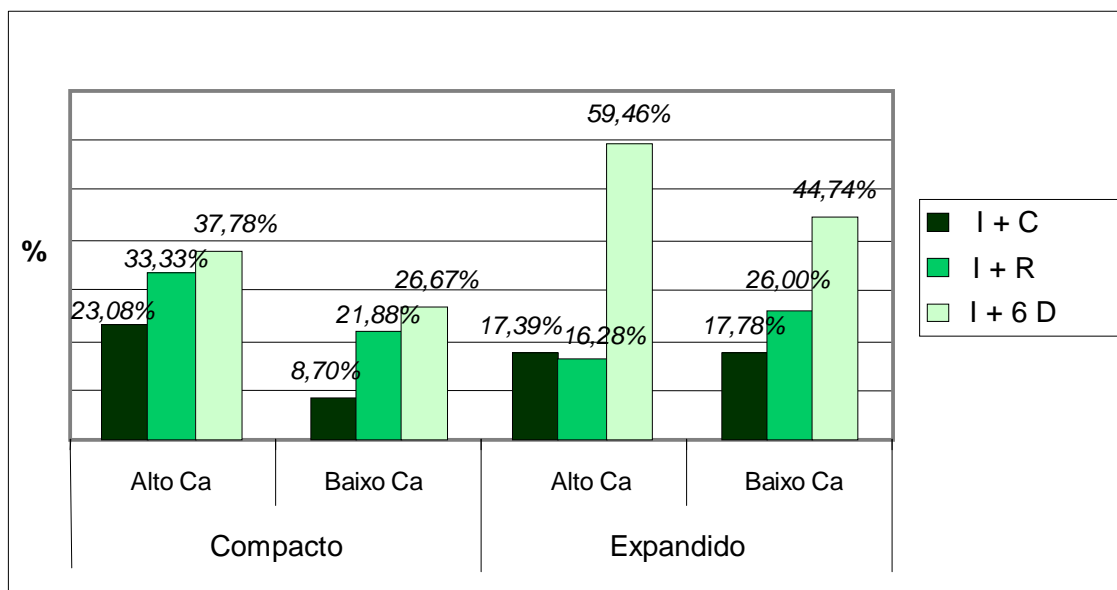


FIGURA 36 - Percentual de descondensação da cromatina obtida 24 horas após a ativação partenogenética de ovócitos eqüinos utilizando-se três protocolos de ativação artificial e duas concentrações de cálcio no meio de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; 6 D: 6 DMAP).

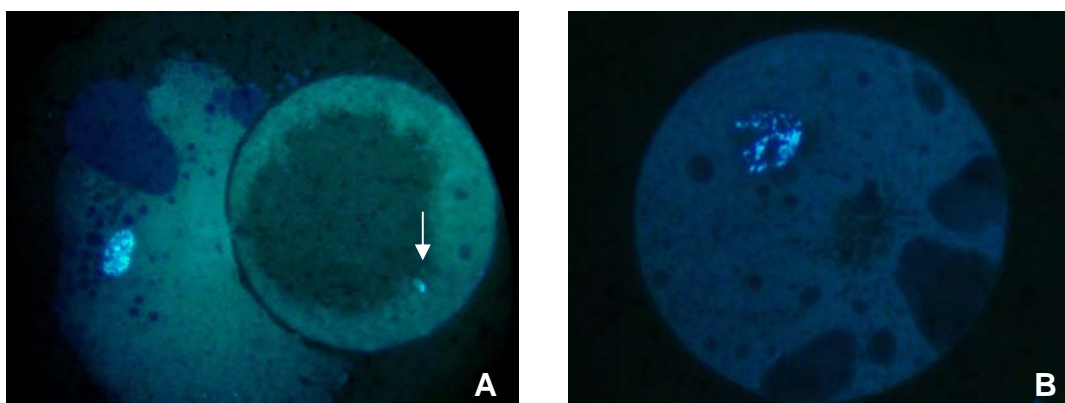


FIGURA 37 – Ovócitos eqüinos ativados, (A): ovócito rompido durante a manipulação com presença de núcleo descondensado com um corpúsculo polar (seta); (B) núcleo iniciando a formação da primeira figura mitótica (microscópio invertido, aumento 400x).

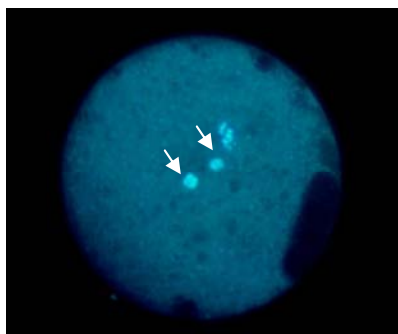


FIGURA 38 – Ovócito eqüino ativado com a formação da primeira figura mitótica e dois corpúsculos polares (seta), (microscópio invertido, aumento 400x).

Na análise dos grupos de ativação partenogenética de ovócitos eqüinos compactos e expandidos aos três dias de cultivo foram obtidas diferenças significativas entre os três protocolos de ativação artificial quando analisados sob determinada concentração de cálcio. Para os ovócitos expandidos ativados em alta concentração de cálcio, o protocolo com ionomicina acrescida de 6 DMAP foi superior ao ionomicina + cicloheximide e não diferiu estatisticamente do grupo ionomicina + roscovitine. (Tabela 7, Figura 39). A caracterização destas clivagens pelo número de núcleos e blastômeros visíveis esta representada no Quadro 1 e Figuras 40 a 45.

TABELA 7 - Percentual de clivagens obtidas aos três dias de cultivo após a ativação partenogênética de ovócitos eqüinos utilizando-se três protocolos de ativação artificial e duas concentrações de cálcio no meio de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; 6 D: 6 DMAP).

Classificação do ovócito	Concentração de cálcio	Protocolo de ativação		
		I + C	I + R	I + 6 D
Compacto	Alta	0,00% a <sup>(1)</sup>	17,24% a	11,63% a
	Baixa	3,85% a	6,45% a	11,63% a
	p <sup>(2)</sup>	1,000	0,247	1,000
Expandido	Alta	0,00% b	4,88% ab	11,11% a
	Baixa	0,00% a	4,26% a	7,69% a
	p <sup>(3)</sup>	1,000	1,000	0,704

<sup>(1)</sup> Letras iguais representam não diferença significativa, ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  entre três protocolos sob determinada concentração de cálcio pelo teste exato de Fisher.

<sup>(2)</sup> Comparação, ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  entre as concentrações de cálcio sob determinado protocolo entre ovócitos compactos pelo teste exato de Fisher.

<sup>(3)</sup> Comparação, ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  entre as concentrações de cálcio sob determinado protocolo entre ovócitos expandidos pelo teste exato de Fisher.

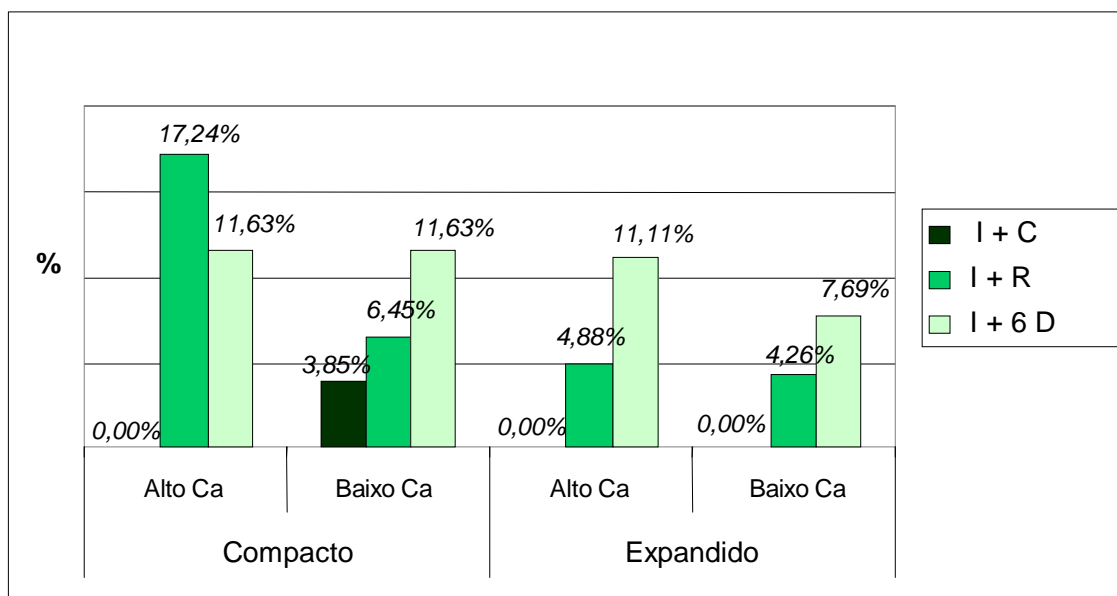


FIGURA 39 - Percentual de clivagens obtidas aos três dias após a ativação partenogênética de ovócitos eqüinos utilizando-se três protocolos de ativação artificial e duas concentrações de cálcio no meio de cultivo (I: ionomicina; C: cicloheximide; R: roscovitine; 6 D: 6 DMAP).

QUADRO 1 – Caracterização das clivagens pelo número de núcleos e blastômeros visíveis obtidos no dia 3 de cultivo após a ativação partenogênética de ovócitos eqüinos classificados como expandidos e compactos, utilizando-se três protocolos e duas concentrações de cálcio no meio de cultivo.

Ovócitos (n)	Meio de cultivo (n)	Clivagens/ nº de núcleos e blastômeros visíveis					
		incompleta	2 células	3 células	4 células	6 células	8 células
Expandido (248)	↓ Ca (128)	Ionomicina + Cicloheximide (42)					
		Ionomicina + Roscovitine (47)		1			1
		Ionomicina + 6 DMAP (39)				2	1
	↑ Ca (120)	Ionomicina + Cicloheximide (43)					
		Ionomicina + Roscovitine (41)	1		1		
		Ionomicina + 6 DMAP (36)		3	1		
Compacto (197)	↓ Ca (100)	Ionomicina + Cicloheximide (26)	1				
		Ionomicina + Roscovitine (31)				2	
		Ionomicina + 6 DMAP (43)		2	2		1
	↑ Ca (97)	Ionomicina + Cicloheximide (25)					
		Ionomicina + Roscovitine (29)	2	1	1	1	
		Ionomicina + 6 DMAP (43)		2		1	2

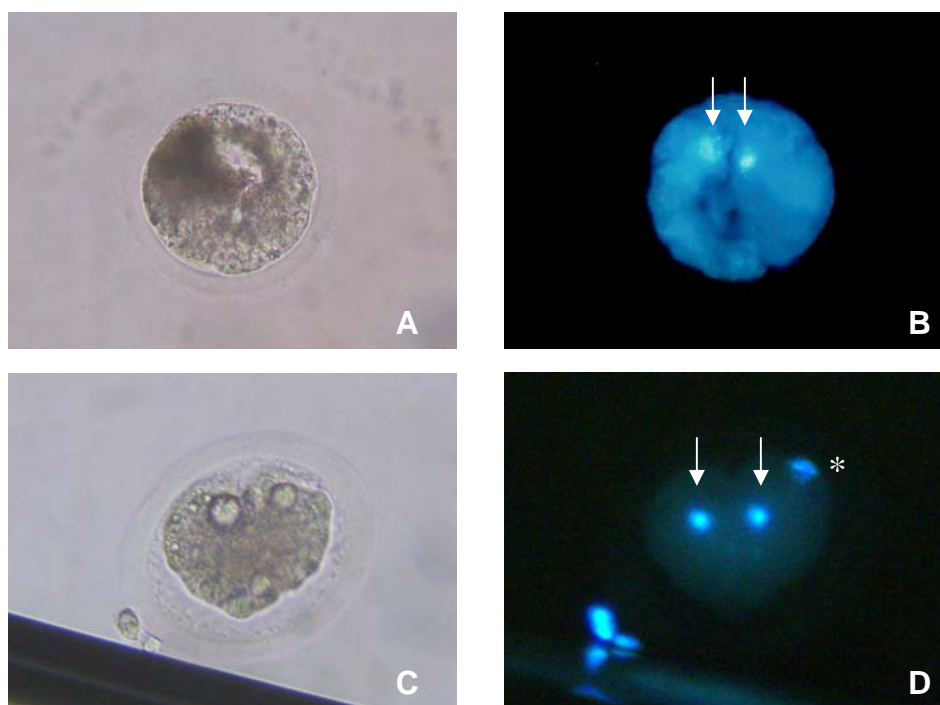


FIGURA 40 A a D – Clivagens incompletas de partenotos eqüinos com três dias de cultivo (seta: núcleos; \*: corpúsculo polar) (microscópio invertido, aumento 400x).

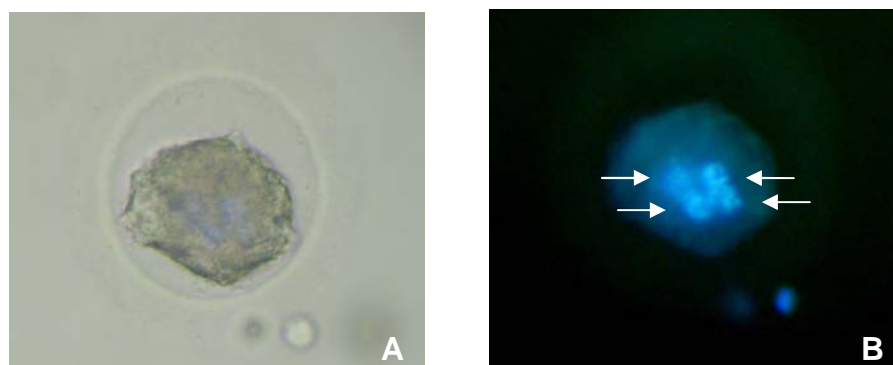


FIGURA 41 A e B – Clivagem incompleta, quatro núcleos sem divisão citoplasmática de partenotos eqüinos com três dias de cultivo (seta: núcleos) (microscópio invertido, aumento 400x).

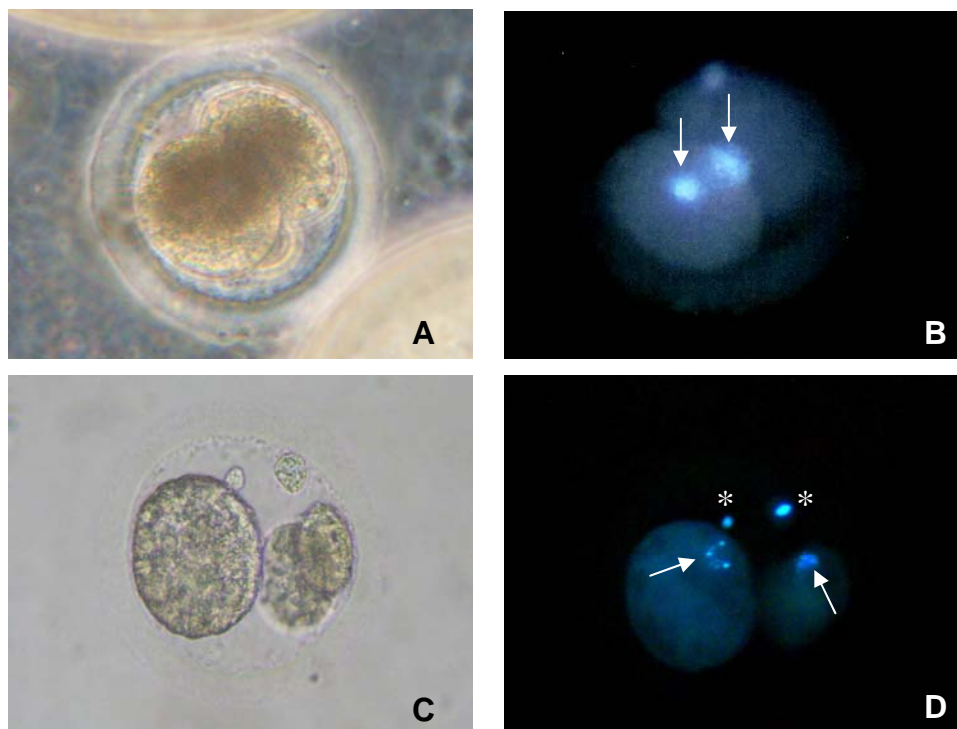


FIGURA 42 A a D – Clivagens completas em duas células de partenotos eqüinos com três dias de cultivo (seta: núcleos, \*: corpúsculo polar) (microscópio invertido, aumento 400x).

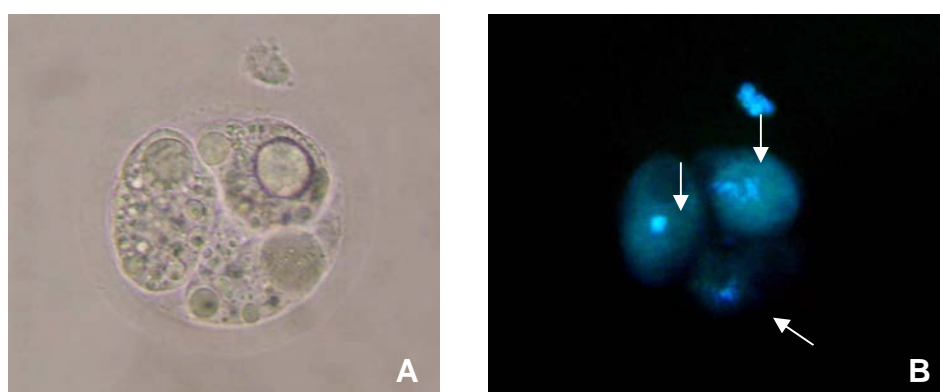


FIGURA 43 A e B – Clivagens completas em três células de partenotos eqüinos com três dias de cultivo (seta: núcleos) (microscópio invertido, aumento 400x).

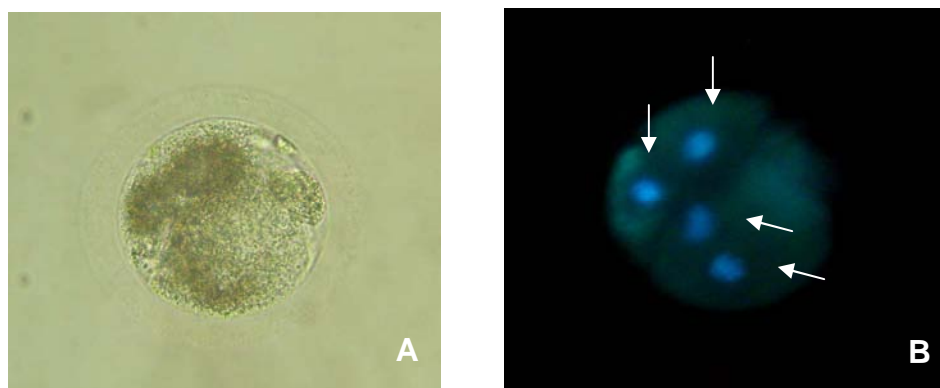


FIGURA 44 A e B – Clivagens completas em quatro células de partenotos eqüinos com três dias de cultivo (seta: núcleos) (microscópio invertido, aumento 400x).

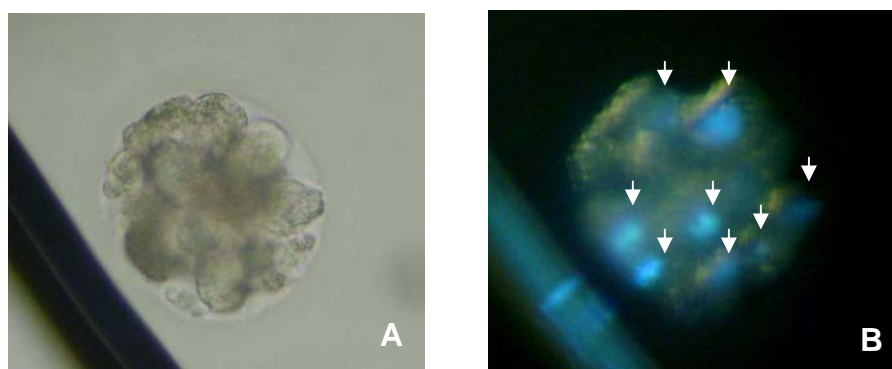


FIGURA 45 A e B – Clivagem completa, com oito núcleos de partenotos eqüinos com três dias de cultivo (seta: núcleos) (microscópio invertido, aumento 400x).

## 5.5 Experimento V

### 5.5.1 Transferência Nuclear em Eqüinos

Na análise das taxas de descondensação da cromatina de ovócitos eqüinos após a transferência nuclear, levando em consideração a classificação do CCO em compacto e expandido, o grau de maturação nuclear em metáfase I e II, o protocolo de ativação artificial com Ionomicina associada ao roscovitine ou ao 6 DMAP e também a exposição prévia ou não ao roscovitine antes da

maturação *in vitro*, pôde-se observar que o único efeito significativo sobre as taxas de descondensação da cromatina (Figura 46) foi o do estágio de maturação nuclear, independentemente da classificação do ovócito, do protocolo de ativação artificial e da exposição ou não ao roscovitine, o percentual de ovócitos com formação de núcleo descondensado no terceiro dia de cultivo foi significativamente maior para a metáfase II ( $p = 0,033$ ) em relação à metáfase I. Não houve efeito significativo de interação de nenhuma ordem entre os outros fatores analisados (Tabela 8, 9 e 10).

TABELA 8 – Porcentagem de formação de núcleo descondensado no terceiro dia de cultivo após a transferência nuclear para ovócitos eqüinos, levando em consideração a classificação do ovócito em compacto e expandido, o grau de maturação nuclear em metáfase I e II, o protocolo de ativação artificial com o uso de Ionomicina associada ao roscovitine ou ao 6 DMAP e também se houve ou não a prévia exposição ao roscovitine antes da maturação *in vitro* (I: ionomicina; R: roscovitine; 6 D: DMAP).

Exposição prévia ao roscovitine	Classificação do ovócito	Estágio de maturação nuclear	Protocolo de ativação artificial	
			I+ R	I + 6 D
Não Exposto	Compacto	Metáfase I	37,50%	22,22%
		Metáfase II	25,00%	50,00%
	Expandido	Metáfase I	0,00%	20,00%
		Metáfase II	14,28%	33,33%
Exposto	Compacto	Metáfase I	0,00%	0,00%
		Metáfase II	20,00%	30,00%
	Expandido	Metáfase I	14,28%	12,50%
		Metáfase II	30,00%	20,00%

TABELA 9 - Análise de *Deviance* e comparação entre ajustes de modelos de regressão logística para explicar o percentual de ovócitos com formação de núcleo descondensado no terceiro dia de cultivo após a transferência nuclear.

Modelo	Efeitos	GL <sup>(1)</sup>	DR <sup>(2)</sup>	DR/GL <sup>(3)</sup>	Diferença de Deviances
M <sub>0</sub>	Nulo	15	19,668	1,311	
M <sub>1</sub>	Protocolo de ativação artificial	14	18,979	1,356	M <sub>0</sub> – M <sub>1</sub> = 0,689
M <sub>2</sub>	Estágio de maturação nuclear	14	14,882	1,063	M <sub>0</sub> – M <sub>2</sub> = 4,786
M <sub>3</sub>	Classificação do ovócito	14	19,222	1,373	M <sub>0</sub> – M <sub>3</sub> = 0,446
M <sub>4</sub>	Exposição prévia ao Roscovitine	14	18,294	1,307	M <sub>0</sub> – M <sub>4</sub> = 1,374
M <sub>5</sub>	Estágio de maturação nuclear + Exposição prévia ao Roscovitine	13	12,915	0,993	M <sub>2</sub> – M <sub>5</sub> = 1,967
M <sub>6</sub>	Estágio de maturação nuclear + Protocolo de ativação artificial	13	14,139	1,088	M <sub>2</sub> – M <sub>6</sub> = 0,743
M <sub>7</sub>	Estágio de maturação nuclear + Classificação do ovócito	13	14,441	1,111	M <sub>2</sub> – M <sub>7</sub> = 0,441
M <sub>8</sub>	(Estágio de maturação nuclear + Exposição prévia ao Roscovitine)* Exposição prévia ao Roscovitine	12	11,957	0,996	M <sub>5</sub> – M <sub>8</sub> = 0,958
M <sub>9</sub>	(Estágio de maturação nuclear + Exposição prévia ao Roscovitine)* Exposição prévia ao Roscovitine * Protocolo de ativação artificial	8	10,130	1,266	M <sub>8</sub> – M <sub>9</sub> = 1,827

<sup>(1)</sup> Número de graus de liberdade associado a deviance residual

<sup>(2)</sup> Deviance residual

<sup>(3)</sup> Razão entre deviance residual e o número de graus de liberdade

$$X^2_{1; 0,05} = 3,84 ; X^2_{4; 0,05} = 9,48$$

TABELA 10 - Ajuste do modelo logístico para explicar o percentual de ovócitos com formação de núcleo descondensado no terceiro dia de cultivo em função do estágio de maturação no momento da transferência nuclear.

Coefficiente	Estimativa	Erro-padrão	p
Intercepto	-1,89	0,35	<0,001
Metáfase II	0,94	0,44	0,033

Deviance Residual = 14,882 com 14 graus de liberdade



FIGURA 46 – Descondensação de cromatina após ativação artificial de ovócitos eqüinos reconstituídos por meio de TN, o núcleo apresenta-se duas a três vezes maior do que o original da célula doadora, com nucléolo ou alguma cromatina condensada (microscópio invertido, aumento de 400x).

## 6 DISCUSSÃO

A clonagem em eqüinos é uma biotecnologia em uso clínico, comercial e sua eficiência vem aumentando. Os potros produzidos por meio da clonagem podem diferir no fenótipo e comportamento do animal original, no entanto, terão a mesma capacidade reprodutiva do animal doador de núcleo. Isso acontece especialmente nos machos clonados, nos quais o DNA mitocondrial não é passado para a progênie (HINRICHS 2006a).

A formação de bancos de células é uma indicação importante para a preservação de material genético de animais com potencial para serem clonados, e que podem aguardar o maior desenvolvimento/eficiência desta biotecnologia. Este procedimento tem sido oferecido por várias companhias comerciais, as quais recebem os tecidos, em geral biopsias de pele, que são processadas e cultivadas para o estabelecimento de estoques de células congeladas em nitrogênio líquido. O cultivo pode ser realizado com a obtenção de células de animais mortos a horas ou dias, desde que o tecido seja coletado o mais rápido possível e refrigerado (HINRICHS, 2005).

O laboratório da FMVZ – UNESP – Botucatu é o único laboratório brasileiro e um dos únicos na América Latina que se dedica a pesquisas envolvendo processos de PIV na espécie eqüina. Como a equideocultura têm um papel importante no agronegócio brasileiro, a existência de um laboratório que se dedique ao estudo da reprodução desta espécie é fundamental para o país. Sendo assim um maior estudo das etapas envolvidas nesta biotecnologia pode acrescentar muito ao entendimento dos fatores que afetam a produção de clones viáveis a as similaridades e diferenças entre os potros clonados e os animais doadores de núcleo.

Durante a transferência nuclear a área do citoplasma ovocitário contendo a cromatina, é removida por meio de micromanipulação, criando assim um ovócito enucleado ou citoplasto. Para que ocorra a reprogramação nuclear a célula somática do doador genético em cultivo é sincronizada em estágio G0/G1 do ciclo celular e combinada por meio de eletrofusão ou injeção direta com o citoplasto. O ovócito reconstituído, contendo o material nuclear da célula doadora, é ativado artificialmente para que se iniciem as divisões celulares (HINRICHS, 2005).

Os métodos mais comuns para obter a quiescência celular (G0/G1) em células doadoras de núcleo, destinadas à transferência nuclear são a privação de soro e o cultivo até a obtenção da confluência. No experimento I foram comparados os dois sistemas de sincronização do ciclo celular de fibroblastos eqüinos, analisando-se a integridade de membrana e o índice de células sincronizadas em G0/G1.

Quando se utilizou a técnica de marcação do tapete celular com corantes fluorescentes e avaliação por meio de microscópio de fluorescência, as células foram divididas em duas categorias: vivas e mortas. Esta diferenciação se mostra importante, pois, um alto número de núcleos exibindo DNA fragmentado após a privação de soro parece ser um fator crítico nos resultados de transferência nuclear. Observações de abortamento e morte neonatal em bezerros obtidos de transferência nuclear podem estar relacionados com as condições do cultivo e a ocorrência de fragmentação do DNA segundo KATO et al. (1998). Em humanos, a privação de soro por mais de 48 horas levou a alteração na expressão de pelo menos dez conjuntos de genes em um total de 462 genes (IYER et al., 1999) que após a adição de soro voltaram a ser regulados, indicando que a privação do soro leva a alteração na transcrição, diminuindo a viabilidade (KUES et al., 2000). De acordo com diversos autores a privação de soro leva a uma maior taxa de apoptose, replicação inapropriada do DNA e alterações na transcrição quando comparada com a confluência (STICE et al., 2000; KUES et al., 2000; GIBBONS et al., 2002; KATO et al., 1998; CHO et al., 2005). No presente estudo não foram observadas diferenças significativas ( $p = 0,661$ ) entre os grupos quanto às taxas de integridade de membrana, discordando da literatura que aponta a superioridade do cultivo até a confluência celular como método de sincronização do ciclo celular. Esta maior resistência dos fibroblastos em cultivo em sofrer lesões de membrana pode estar relacionada ao baixo número de passagens realizadas antes do início da sincronização do ciclo celular. Diversos trabalhos encontrados na literatura utilizaram um alto número de passagens (10 -15) no cultivo das células somáticas destinadas a transferência nuclear (KUBOTA et al., 2000; CHO et al., 2005). O grande número de passagens aumenta significativamente a incidência de anormalidades celulares (KUBOTA et al., 2000; CHO et al., 2005).

Na avaliação do efeito da privação de soro sobre o ciclo celular a porcentagem de células em G0/G1 foi elevada em comparação aos resultados apresentados por Hayes et al. (2005), que demonstraram um declínio de 84% para 72% de células em G0/G1 depois de cinco dias de cultivo, o que não foi observado no presente experimento, pois as células se mantiveram com taxas ( $p = <0,001$ ) de G0/G1 acima de 90% durante as 48, 72, 96, 144 e 168 horas após o início da privação de soro. Por outro lado, para o grupo confluência foram encontrados índices de G0/G1 significativamente mais baixos (69,6%). Neste grupo, apesar de visualmente com quatro dias de cultivo, as células terem preenchido a base da garrafa, o período pode não ter sido suficiente para a sincronização de um grande número de células em G0/G1. Kubota et al. (2000), obtiveram 65% de células em fase G0/G1, em cultivos de fibroblastos bovinos pré congelação. As menores taxas de células em G0/G1 foram encontradas no primeiro período de 24hs de privação de soro, onde a porcentagem foi de 75,2%, corroborando com os achados de Hayes et al. (2005) que obtiveram somente 40% de células em G0 nas primeiras 24 horas de privação de soro, indicando que esta pode tratar-se de uma fase de “crescimento celular”.

Gibbons et al. (2002) atribuíram a alta sincronização das células em G0/G1 e conseqüente alta viabilidade ao nascimento de bezerros clonados, quando as células doadoras de núcleo em confluência foram tratadas com baixas concentrações ( $<20\mu\text{M}$ ) de roscovitine 24 horas antes da transferência. Neste caso o roscovitine inibiu não só o Cdk1, associado à supressão da maturação e ativação artificial, como também o Cdk2, Cdk5 e Cdk7 (MCCLUE et al., 2002) mantendo o número de fibroblastos em estágio G1 (ALESSI et al., 1998). Estes achados corroboram com os resultados de Hinrichs et al (2006b e 2007a) que obtiveram baixos índices de perdas no início da gestação (0%, HINRICHS et al., 2006b e 12,5% HINRICHS et al., 2007a), quando comparado a 78,5%, 100%, 50% e 52,6% (GALLI et al. 2003; WOODS, et al., 2003; VANDERWALL et al., 2004, LAGUTINA et al., 2005) para células doadoras de núcleo sincronizadas por meio de privação de soro e confluência respectivamente.

Apesar dos resultados do experimento I demonstrarem que os fibroblastos eqüinos em cultivo apresentaram altos índices de sincronização do

ciclo celular, em especial nos grupos que sofreram privação de soro por mais de 90 horas, no experimento V, optou-se pela utilização de células em confluência, pela praticidade desta metodologia frente à dificuldade na programação das colheitas de ovócitos devido à sistemática de abate eqüino.

Nos experimentos II, III e IV procurou-se avaliar os citoplastos receptores para a transferência nuclear. Foram utilizados ovócitos eqüinos classificados quanto ao aspecto das células do *cumulus* e às taxas de recuperação destes ovócitos diferiram entre os trabalhos do mesmo grupo de estudo.

Hinrichs e Williams (1997) e Choi et al. (2002c) obtiveram 65% de ovócitos classificados como expandidos versus 30% classificados como compactos, enquanto Hinrichs et al. (2005) obtiveram 88% compactos versus 63% expandidos. No presente estudo foram obtidos 54,90% ovócitos classificados como expandidos versus 45,10% como compactos. Estas diferenças devem estar relacionadas principalmente à sazonalidade e população/característica folicular presentes nos ovários no momento das colheitas.

As taxas de metáfase II após as 30 horas maturação *in vitro* obtidas no experimento II (36,02% e 29,61% para CCO classificados como expandidos e compactos respectivamente) foram inferiores às de ovócitos expandidos (60-70%) e similares as de ovócitos compactos (20-30%) relatadas por Choi et al. (2003 e 2004b). Os resultados inferiores obtidos no presente experimento podem estar relacionados a dois fatores: 1) à competência dos ovócitos no momento da colheita; 2) ao longo tempo decorrido entre o abate e o início do cultivo. A competência meiótica na espécie eqüina, assim como nas outras espécies, está associada à configuração da cromatina no estágio de vesícula germinativa antes do cultivo (MATTSON e ALBERTINI, 1990; SCHRAMM et al., 1993; HINRICHS e WILLIAMS, 1997; HINRICHS e SCHMIDT, 2000). A condensação da cromatina nos ovócitos eqüinos é especialmente diferenciada em relação ao grau de expansão das células do *cumulus*. Quando foram comparados os ovócitos eqüinos imaturos que apresentavam as células do *cumulus* compactas (provenientes de folículos viáveis e de baixa competência meiótica) com os que apresentavam as células expandidas (provenientes de folículos em diferentes estágios de atresia e com alta competência meiótica),

foi observado que os compactos continham a cromatina difusa enquanto os expandidos apresentaram a cromatina mais densa quando em estágio de vesícula germinativa, o que pode representar uma maior resistência às injúrias externas como por exemplo tempo de transporte e fatores externos pós morte (HINRICHS et al., 1993; HINRICHS et al., 1995a; ALM e HINRICHS, 1996; PEDERSEN et al., 2000). Hinrichs et al. (2005) relataram ainda que um grande tempo entre o abate e a avaliação de ovócitos imaturos (5 – 9 horas) pode estar associado com um aumento significativo nas taxas de degeneração (58%) para ovócitos classificados como compactos, e que a configuração da cromatina se altera significativamente com o decorrer do tempo de estocagem dos ovários (1 hora versus 5-9 horas), o que está diretamente relacionado à diminuição da competência meiótica. Os resultados obtidos no experimento II, corroboram com os achados acima descritos, onde foram obtidas diferenças significativas entre as taxas de degeneração de ovócitos expandidos (23,22%) e compactos (38,82%) após 30 horas de maturação *in vitro*. Apesar do intervalo entre colheita dos ovários no matadouro e cultivo dos ovócitos no presente trabalho ser de aproximadamente 10 horas, a degeneração de ovócitos susceptíveis parece ocorrer rapidamente, pois em estudos anteriores não foram observadas diferenças significativas entre as taxas de degeneração de ovócitos provenientes de ovários estocados por 1,5 a 8,5 horas (GUIGNOT et al., 1999) ou 3 a 15 horas (DEL CAMPO et al., 1995). No entanto, as taxas de maturação nestes estudos foram consideradas menores de 50%, semelhantes às obtidas no experimento II após 30 horas de cultivo *in vitro*, o que pode sugerir que os danos aos ovócitos ocorram precocemente entre 1 a 3 horas após a colheita do ovário e que acima de 20 horas até os ovócitos expandidos com a cromatina condensada podem ser afetados (LOVE et al., 2003).

Apesar da estocagem dos ovários levar a altas taxas de degeneração principalmente para ovócitos classificados como compactos, o atraso do início da maturação representado pelo alto tempo de transporte, pode ser um fator importante no aumento na competência de ovócitos eqüinos refletindo na alta taxa de desenvolvimento embrionário após ICSI. Nos CCO classificados como compactos as taxas de produção de blastocistos após a ICSI são mais baixas em ovócitos recém coletados quando comparados aos estocados por 5-9 horas (HINRICHS et al., 2005). Estes achados corroboram totalmente com os de

Blondim et al. (1997) para os quais as alterações que ocorrem nos folículos pós morte (4 horas a 30°C) contribuem para aumentar a maturação citoplasmática e conseqüentemente a competência ovocitária em bovinos. No entanto, o acesso ao potencial real de desenvolvimento dos ovócitos eqüinos é complicado pelo fato da fertilização *in vitro* não ter sucesso para a espécie.

Foi proposto no experimento II a avaliação da eficiência do uso do roscovitine como inibidor da meiose no preparo de citoplastos eqüinos. Para isso os ovócitos classificados como compactos e expandidos foram avaliados em duas situações: logo após a exposição de 24 horas e após a exposição de 24 horas e maturação *in vitro* por 30 horas. Quando os ovócitos eqüinos imaturos foram expostos ao roscovitine, não foram obtidas diferenças significativas entre os diferentes estágios de maturação nuclear, sendo que as taxas de VG foram 53,85%, 54,43% e 53,33%, 43,33% para os CCO classificados como expandidos e compactos nos grupos não expostos e expostos ao roscovitine por 24 horas respectivamente, corroborando aos resultados de Choi et al. (2006a) onde a proporção de ovócitos classificados como tendo uma vesícula germinativa viável após a exposição ao roscovitine foi de 53-70%, sem diferença significativa quando comparado ao grupo não exposto à droga. Estes resultados demonstram que a droga não interferiu na configuração nuclear dos ovócitos eqüinos imaturos independente da classificação quanto à expansão das células do *cumulus*.

Em 2002 Franz e colaboradores avaliaram três doses (22µM; 66µM e 200µM) de roscovitine para o bloqueio meiótico de ovócitos eqüinos imaturos classificados como expandidos e compactos e obtiveram melhores taxas de inibição meiótica utilizando a concentração de 66µM quando comparada a 22µM e sem diferença significativa quando comparada a 200µM ( $p = 0,003$ ) (FRANZ et al., 2003). Neste mesmo trabalho, Franz et al. (2002) também compararam dois tempos de exposição ao 66µM de roscovitine, 24 e 32 horas seguidos de 24 horas de maturação *in vitro* e não obtiveram diferenças significativas entre os grupos para as taxas de metáfase II, sendo que para os ovócitos classificados como expandidos foram obtidos, 78%, 73% e 73% de MII e para os ovócitos classificados como compactos foram obtidos, 75%, 63% e 68% de MII para o controle, 24 e 32 horas de exposição ao roscovitine

respectivamente. No experimento II do presente estudo, assim como Franz et al (2002) e Choi et al. (2006a) não foram obtidas diferenças significativas entre as taxas de maturação nuclear (MII) de ovócitos eqüinos classificados como expandidos e compactos expostos ao roscovitine antes da maturação *in vitro* (36,02%, 29,61% e 43,02%, 33,85% para os ovócitos classificados como expandidos e compactos nos grupos não expostos e expostos ao roscovitine respectivamente). Este resultado demonstra que o roscovitine foi efetivo na manutenção da quiescência meiótica de ovócitos eqüinos por 24 horas e que este efeito foi perfeitamente reversível.

Estudos realizados por Ponderato et al. em 2001 demonstraram que a exposição prévia de ovócitos bovinos imaturos ao roscovitine foi benéfica a taxa de formação de blastocistos quando comparada ao grupo não exposto. No entanto, para os ovócitos eqüinos houve um comportamento diferente entre os ovócitos classificados como expandidos e compactos em relação às taxas de desenvolvimento embrionário após a exposição ao roscovitine. Para ovócitos eqüinos classificados como expandidos as taxas de maturação permaneceram semelhantes (64-68%) entre os grupos controle e exposto, no entanto quando se avaliou as taxas de clivagem (89% versus 76%) e desenvolvimento de mórula e blastocistos (35% versus 19%) após a ICSI, houve uma diferença significativa entre os grupos (CHOI et al., 2006a). Já o tratamento dos ovócitos eqüinos classificados como compactos aumentou o número de núcleos às 96 horas de cultivo (FRANZ et al., 2003), e manteve o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (21-37%, comparado com 14-27% para o controle, CHOI et al., 2006a). Recentemente, Choi et al. (2007) compararam em ovócitos classificados como compactos o efeito da exposição ao roscovitine por 16-18 horas e da incubação na mistura 40% TCM199 + sal de Earle's + 40% TCM 199 + sal de Hank's e 20% SFB a temperatura ambiente (22-27°C) por 16-18 horas sobre as taxas de MII (23% versus 22%), clivagem (75 versus 86%) e formação de blastocistos após a ICSI (17 versus 23%) e não obtiveram diferenças significativas. Quando a mesma análise foi realizada em ovócitos classificados como expandidos a incubação na mistura de TCM 199 pareceu benéfica para o desenvolvimento embrionário, em relação aos expostos ao roscovitine (34% versus 12%) mas não diferiu estatisticamente dos ovócitos do grupo controle (25%, CHOI et al., 2006b). Estes resultados confirmam um

efeito diferenciado do roscovitine em ovócitos eqüinos classificados como compactos e expandidos, pois o roscovitine mantém o desenvolvimento da competência em ovócitos compactos (FRANZ et al., 2003), mas diminui o desenvolvimento da competência de ovócitos expandidos (FRANZ et al., 2003; CHOI et al., 2006b). Assim de acordo com Franz et al. (2003) e Choi et al. (2006b) o tempo adicional em cultivo sob as condições de bloqueio meiótico é importante para a maturação citoplasmática de ovócitos compactos mas promove uma maturação excessiva dos ovócitos expandidos. E essa diferenciação está relacionada com a origem dos ovócitos: compactos são originados de folículos viáveis e relativamente jovens na configuração da cromatina e na competência meiótica, enquanto os expandidos são originados de folículos em atresia já maduros com competência meiótica e para o desenvolvimento já adquirida (HINRICHS e WILLIAMS, 1997; HINRICHS et al., 2005). Efeito semelhante não foi observado no presente experimento, uma vez que a diferença no potencial de maturação nuclear entre CCO expandidos e compactos após 30 horas de maturação *in vitro* desapareceu após o tratamento com roscovitine. Tal resultado pode ter ocorrido devido ao longo tempo de transporte que iguala a competência dos CCO pois induz a modificações semelhantes a atresia também nos CCO classificados como compactos.

São dois os fatores que influenciam o sucesso da transferência nuclear: 1) aspectos biológicos envolvendo diferenças espécie - específicas, como a inter-relação e as características de carioplastos e citoplastos; 2) aspectos técnicos, como a preparação dos citoplastos (WILMUT, 2003), uma etapa crucial na transferência nuclear, pois participa na correta reprogramação do núcleo transferido, assegurando o desenvolvimento de embriões reconstituídos (FULKA et al., 2004). Por essa razão, no experimento III, foi avaliada a eficiência da enucleação química de ovócitos no preparo de citoplastos receptores eqüinos.

Na primeira fase do experimento III, com o objetivo de estabelecer a melhor dose/resposta, os ovócitos eqüinos com 30 horas de maturação *in vitro*, foram expostos a diferentes concentrações de demecolcina por 2 horas. A porcentagem de formação de protrusão na região cortical ovocitária foi de 32,07%, 30,61% e 44,89% para 0,05µg/mL, 0,10µg/mL e 0,20µg/mL de

demecolcina respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas ( $p = 0,141$ ) entre os grupos. As taxas de protrusão obtidas foram semelhantes às observadas por Saraiva (2006), em ovócitos bovinos tratados com 0,05  $\mu\text{g/mL}$  de demecolcina, ( $55,1 \pm 13,0\%$ ). No entanto, estes resultados foram inferiores àqueles observados por outros autores, que relataram formação de protrusão em aproximadamente 70% dos ovócitos tratados, em suínos (KAWAKAMI et al., 2003) e bovinos (LI et al., 2004). Tal fato pode ter sido decorrente da utilização de ovócitos sem prévia seleção da presença do primeiro corpúsculo polar, procedimento realizado pelos autores citados e, portanto, sem características nucleares indicativas de maturação, o que implica na utilização de uma população heterogênia de ovócitos. Para a espécie eqüina esta observação corrobora com os resultados obtidos, pelas baixas taxas de maturação nuclear, em média 32,81% de MII e pela baixa qualidade dos ovócitos eqüinos, diminuindo assim a resposta a demecolcina.

Em geral na espécie bovina, a protrusão nuclear fica localizada no espaço perivitelínico próxima do 1º CP, no entanto, Saraiva (2006), observou uma correlação positiva entre o tempo de maturação *in vitro* e a distância entre as estruturas, aparentemente uma diminuição no tempo de cultivo promove a formação de protrusão mais próxima ao CP, o que facilita a enucleação. Para a espécie eqüina, o encurtamento do período de maturação *in vitro*, não traria o mesmo benefício visto que o 1º CP está freqüentemente deslocado da posição esperada em relação à metáfase (DOMINKO et al., 2000). Além disso, uma outra característica da espécie eqüina é a rápida degeneração do CP após a sua extrusão, o que dificulta a utilização desta característica morfológica na estimativa da maturação nuclear após o cultivo.

Na segunda fase do experimento III, foi estabelecida a comparação entre as espécies bovina e eqüina, para tanto foi selecionada para bovinos a melhor dose resposta estabelecida por Saraiva (2006) 0,05 $\mu\text{g/ml}$ . Para eqüinos, apesar de não terem sido obtidas diferenças significativas entre os grupos na primeira fase deste experimento, numericamente a concentração de 0,20 $\mu\text{g/ml}$  de demecolcina apresentou melhores taxas de formação de protrusão na região cortical ovocitária (44,89%). Não foram obtidas diferenças significativas em relação às taxas de formação de protrusão nuclear na região cortical, quando foram comparados ovócitos bovinos e eqüinos classificados

como compactos (38,76% versus 23,64%, respectivamente,  $p = 0,070$ ), ovócitos bovinos e eqüinos classificados como expandidos (28,30%,  $p = 0,243$ ) e entre os ovócitos eqüinos classificados com *cumulus* compacto e expandido ( $p = 0,738$ ).

No presente experimento, foi observado que parte dos ovócitos bovinos apresentavam somente uma estrutura no espaço perivitelínico, a protrusão contendo toda a cromatina (Figura 31), o que provavelmente está relacionado à incompleta extrusão do corpúsculo polar, possivelmente causada pela alta atividade do MPF ou falta de microtúbulos (ação da demecolcina) (SARAIVA, 2006). De acordo com Li et al. (2005) a organização e desorganização do citoesqueleto, em particular microtúbulos e microfilamentos, têm papel fundamental na formação do fuso meiótico, alinhamento e segregação dos cromossomos, movimento do material nuclear de uma posição central para a região cortical e extrusão de 1º e 2º CP.

Apesar da grande quantidade de estudos em murinos, leporinos, coelhos, suínos e bovinos, este é o primeiro relato do uso de demecolcina na enucleação química de ovócitos eqüinos, sendo assim, as razões para as diferenças espécie-específicas, ainda não são bem compreendidas.

A resposta normal de ovócitos maduros à fertilização, inclui a exocitose dos grânulos corticais, finalização da meiose, formação dos pró-núcleos e clivagem. Estas respostas caracterizam a ativação ovocitária e são associadas ao influxo de cálcio durante a fertilização (CUTHBERTSON et al., 1981), que promove a destruição transitória de proteínas como o CSF e o Mos (MASUI et al., 1984; PARRISH et al., 1992), levando a degradação da ciclina B, promovendo a queda do MPF. Os ovócitos eqüinos apresentam baixa taxa de ativação partenogenética espontânea (1,42%, CHOI et al., 2001a; 4-5%, HINRICHS et al., 1995b; 0%, Dell AQUILA et al., 1999; 0% LI et al., 2000). Assim essa etapa é necessária nos protocolos de transferência nuclear, com o objetivo de induzir a fusão e reprogramação do núcleo injetado no citoplasto receptor e iniciar as divisões celulares (XIHE et al., 2000). As taxas de produção de potros nascidos por embriões transferidos, pré-ativados com ionomicina foi de 25%, maior do que a reportada por outros laboratórios os quais associaram ionomicina + cicloheximide (0%, Vanderwall et al., 2004) ou cicloheximide + 6 DMAP (6%, Galli et al., 2003, 1% Lagutina et al., 2005), o

baixo desenvolvimento até o estágio de blastocisto pode ser relacionado à ineficiência da ativação artificial de ovócitos eqüinos (HINRICHS et al., 2006b).

Foi demonstrado que a idade dos ovócitos (tempo em que permanecem no meio de maturação para atingir MII) influencia as taxas de ativação artificial (CLARKE e MASUI, 1983). Ovócitos envelhecidos tem a capacidade de sintetizar CSF diminuída e assim um estímulo simples para ativação seria o suficiente para a obtenção de resultados positivos (HINRICHS et al., 1995b). No entanto, a falha de tratamentos utilizando somente ionóforo de cálcio e etanol em induzir taxas significativas de ativação artificial quando comparados à combinação com cicloheximide, sugere que só o pico inicial de cálcio não é suficiente para inibir o CSF (HINRICHS et al., 1995b). Sendo assim, no experimento V, foram avaliadas combinações de drogas com diferentes mecanismos de ação na tentativa de estabelecer o melhor protocolo de ativação artificial de ovócitos bovinos e eqüinos maturados *in vitro* por 24 e 30 horas respectivamente. Hinrichs et al. (1995b) obtiveram diferenças significativas entre as taxas de ativação de ovócitos eqüinos quando foram utilizados etanol, etanol + cicloheximide, ionóforo de cálcio e ionóforo de cálcio + cicloheximide na ativação artificial de ovócitos classificados como compactos (2%, 19%, 11% e 26%) e expandidos (22%, 24%, 11% e 70%), respectivamente. Neste trabalho de Hinrichs e colaboradores em 1995(b) o tratamento com ionóforo de cálcio + cicloheximide foi benéfico para ovócitos classificados como expandidos em relação aos compactos, pois o cultivo por 30 horas em meio de maturação pode representar uma “hiper” maturação ou “envelhecimento” ovocitário, levando uma menor capacidade de produção de CSF e manutenção de baixos níveis de MPF necessário para uma ativação artificial eficiente. Li et al (2000) obtiveram resultados semelhantes aos descritos por Hinrichs et al (1995b), com taxas de 56% de finalização da meiose e descondensação da cromatina resultantes da ativação artificial de ovócitos eqüinos expandidos. Aparentemente os ovócitos compactos em MII tem habilidade reduzida em responder aos estímulos da ativação (HINRICHS et al., 1995b) e habilidade reduzida para formar pró-núcleo masculino após a ICSI (Dell AQUILA et al., 1997b). No entanto, no presente experimento, não foram obtidas diferenças significativas entre os ovócitos eqüinos classificados como compactos quanto às taxas de ativação após a exposição aos diferentes

protocolos. Mais uma vez o efeito do longo tempo de transporte sobre os ovócitos com *cumulus* compacto pode estar igualando a sua resposta à do grupo de ovócitos com *cumulus* expandido. Por outro lado, quando ovócitos eqüinos com *cumulus* expandido foram utilizados, observou-se um efeito positivo na associação ionomicina + 6 DMAP, independente da concentração de cálcio utilizada.

Uma comparação entre as taxas de ativação artificial de bovinos e eqüinos é arriscada, visto que como descrito no experimento II, as taxas de degeneração pré (28,01%) e pós (31,02%) maturação *in vitro* são altas para a espécie eqüina o que repercute em menores taxas de MII e conseqüentemente de ativação artificial. No presente experimento observou-se que em ovócitos bovinos o tratamento com ionomicina associada a drogas que inibem a síntese protéica como o cicloheximide ou que atuam diretamente inibindo o MPF foi mais eficiente em induzir a ativação ovocitária, independente da concentração de cálcio livre no meio. Comportamento semelhante foi observado em ovócitos eqüinos com *cumulus* compacto, mas não em expandido onde a utilização de cicloheximide, independente da concentração de cálcio, levou a níveis inferiores de ativação ovocitária. Hinrichs et al. (1995b) obtiveram taxas de 49% versus 55% de ativação utilizando o protocolo de ionóforo de cálcio + cicloheximide para ovócitos eqüinos e bovinos em MII respectivamente. Estes resultados são superiores aos obtidos no presente experimento utilizando ionomicina + cicloheximide com baixa concentração de cálcio em ovócitos bovinos (34,78%) e eqüinos (8,70%). No presente estudo, o tratamento com cicloheximide, foi benéfico quando aplicado a ovócitos bovinos, independente da concentração de cálcio utilizada, apresentando resultados de ativação semelhantes aos obtidos com ionomicina + roscovitine ou 6 DMAP (65,12%, 60,16% e 48,89% nos protocolos acima com alto cálcio e 34,78%, 48,84% e 40,82% nos protocolos acima com baixo cálcio). Estes resultados corroboram com os de Presicce e Yang (1994) que obtiveram taxas de ativação artificial de ovócitos bovinos entre 40 e 70%.

A ionomicina induz um único aumento de cálcio intracelular após 1 a 5 minutos (NAKADA e MIZUNO, 1998), o que pode não ser suficiente para manutenção da ativação ovocitária, visto que durante a fertilização foi observado um pico de cálcio inicial e prolongado (521 nM), responsável pela

exocitose dos grânulos corticais e a indução da retomada da meiose (KLINE e KLINE, 1992) seguido de um período de 1-3 horas de picos menores (368 nM) e intermitentes em intervalos de 5-20 minutos (NAKADA e MIZUNO, 1998). O melhor estímulo para a ativação é um grande número de oscilações nos níveis de cálcio com alta amplitude nos picos, resultando em uma melhora significativa no desenvolvimento pós-implantação (BOS-MIKICH et al., 1997), e relacionado com a expressão gênica da cromatina transferida, assim como no controle transcripcional e no estímulo da expressão gênica das células somáticas (DOLMETSCH et al., 1997, Li et al., 1998). O estrôncio tem essa característica pois mobiliza o cálcio de estoques citoplasmáticos (CUTHBERTSON, et al., 1981), induzindo múltiplos picos de cálcio em camundongos (BOS-MIKICH et al., 1995) de baixa frequência e amplitude, mas de longa duração quando comparados aos observados durante a fertilização (KLINE e KLINE, 1992; JELLERETTE et al., 2000). No entanto, as taxas de ativação artificial obtidas para ovócitos bovinos ativados com ionomicina + estrôncio, no presente experimento, foram de 40,82% e 19,05% para alto e baixo cálcio respectivamente, inferiores as obtidas por Méo et al. (2005) (63,3%), e similares aos 26,7% quando o estrôncio foi utilizado isoladamente (MÉO et al., 2004). A utilização do estrôncio sozinho ou em combinação com ionomicina foi mais efetiva na exocitose dos grânulos corticais quando comparados a ionomicina isolada (MÉO et al., 2005), muito provavelmente pela produção de múltiplos pulsos de liberação de cálcio intracitoplasmático, indicando que a combinação de protocolos com o ionóforo de cálcio têm efeito sinérgico para bovinos (PRESICCE e YANG, 1994), suínos (JILEK et al., 2000) e eqüinos (HINRICHS et al., 1995b).

Baseado nos resultados superiores obtidos nos protocolos ionomicina + cicloheximide, + roscovitine e + 6 DMAP, obtidos para ovócitos bovinos, optou-se pela sua utilização na ativação artificial de ovócitos eqüinos. A formação de pró-núcleo após ativação artificial de ovócitos eqüinos utilizando ionomicina + 6 DMAP, inibidor da fosforilação protéica, foi de 32% (PIMENTEL et al., 2002), 45% (CARNEIRO et al., 2001) e 60% (GALLI et al., 2007), corroborando com os resultados do presente experimento, no qual taxas de 37,78%, 26,67% para ovócitos classificados como compactos em meios com alta e baixa concentração de cálcio respectivamente e 59,46% e 44,74% para ovócitos

classificados como expandidos em meios com alta e baixa concentração de cálcio foram usados respectivamente. No entanto, as taxas de Choi et al. (2004) foram superiores (83% de clivagem) quando se combinou extrato espermático ao 6 DMAP e acima de 90% para cicloheximide + 6 DMAP (GALLI et al., 2007).

No experimento IV do presente trabalho, para ovócitos eqüinos classificados como compactos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de ativação artificial, em relação às drogas e à concentração de cálcio. Para os ovócitos classificados como expandidos, em meio com alto cálcio, a utilização do 6 DMAP (59,46%) foi superior aos demais grupos (16,28% e 17,39% para roscovitine e cicloheximide, respectivamente). Em meio com baixo cálcio, o grupo de ovócitos ativados com 6 DMAP não diferiu estatisticamente do grupo roscovitine (44,74% e 25,00%, respectivamente) e ambos foram superiores ao grupo cicloheximide (17,78%). Aparentemente, a inibição da fosforilação protéica promovida pelo 6 DMAP e a inibição específica do MPF, por meio da adesão de ATP, promovida pelo roscovitine foram benéficas para a ativação artificial de ovócitos eqüinos classificados como expandidos, em relação à utilização do cicloheximide como inibidor da síntese protéica.

Foi relatado o uso de roscovitine na ativação artificial de ovócitos de ratos (MITALIPOV et al., 2001) e *Xenopus* (FLAMENT et al., 2000), no entanto, em eqüinos este é o primeiro relato do uso de roscovitine na ativação artificial. Foi avaliado somente na injeção intracitoplasmática de 25 $\mu$ M / 50 $\mu$ M juntamente com o extrato espermático, sem benefícios às taxas de ativação quando comparado a utilização de extrato espermático isolado (HINRICHS et al., 2006b). No entanto, os resultados obtidos no presente experimento mostraram que o uso do roscovitine na ativação de ovócitos eqüinos foi eficiente, com índices comparáveis a protocolos já consagrados como o ionomicina + 6 DMAP.

As taxas de clivagem obtidas por Carneiro e colaboradores (2006) não diferiram entre os grupos de ativação partenogênica de ovócitos eqüinos (38%, 33% e 20% para os grupos ionomicina + 6 DMAP, timerosol + DTT e estrôncio + DTT, respectivamente). Os resultados de Carneiro et al. (2006) são superiores ao do presente experimento utilizando o protocolo ionomicina + 6

DMAP, no qual foram obtidos 11,63%, 11,63%, 11,11% e 7,69% nos grupos de ovócitos eqüinos classificados como compactos em alto e baixo cálcio e expandidos em alto e baixo cálcio respectivamente. No entanto, para Carneiro et al. (2006) o número de células obtidas por embrião foi pequeno, sendo que apenas o grupo ionomicina + 6 DMAP chegou ao estágio de mórula (16%), enquanto os outros grupos apresentaram embriões com 2 e 4 células apenas. O bloqueio na primeira divisão celular pode ser devido a deficiências de fatores citoplasmáticos ou falhas na ativação do ovócito receptor (LI et al., 2002). Combinações do tipo pulso elétrico + cicloheximide + etanol + 6 DMAP (9,6% de blastocistos) ou pulso elétrico + cicloheximide + etanol + estrôncio + 6 DMAP (0% de blastocistos) podem afetar a capacidade de desenvolvimento embrionário e não são recomendadas, enquanto o protocolo pulso elétrico + etanol + estrôncio + 6 DMAP apresentou as melhores taxas de formação de blastocistos (25,1%) na ativação artificial de ovócitos bovinos (HOSSEINI et al., 2007).

No presente experimento, apesar de taxas de clivagem de ovócitos eqüinos baixas obtidas no grupo ativado com ionomicina + cicloheximide (0% a 3,85%), apenas os ovócitos classificados como expandidos em alto cálcio apresentaram diferenças significativas entre os diferentes grupos de ativação artificial (11,11%, 4,88% e 0,00% para os meios ionomicina + 6 DMAP, ionomicina + roscovitine e ionomicina + cicloheximide, respectivamente), sendo que o grupo ativado com 6 DMAP e roscovitine não diferiram entre si e corroborando com a observação prévia realizada neste experimento quanto ao mecanismo de ação das drogas utilizadas.

Apesar de altas taxas de ativação artificial de ovócitos eqüinos expandidos, utilizando extrato espermático (72%) obtida por Choi et al. (2002a), a porcentagem de embriões reconstituídos por meio de transferência nuclear e clivados aos quatro dias foi baixa (6 a 22%), e em média dois a quatro núcleos por embrião clivado foi observado (CHOI et al., 2002a). No presente experimento somente 13,79% dos embriões clivados atingiram o desenvolvimento até oito células. O bloqueio embrionário ocorre em embriões bovinos principalmente no estágio de 8 células e está mais relacionado com a qualidade citoplasmática do ovócito (MEIRELLES et al., 2004). Acredita-se que dois mecanismos sejam causadores do bloqueio embrionário: a inabilidade em

superar a repressão da cromatina e ativar importantes genes de desenvolvimento e reação às injúrias causadas pelo ambiente de cultivo (BETTS e KING, 2001).

O cultivo de embriões eqüinos *in vitro* pode ser associado ao desenvolvimento de prenheses anormais, nas quais o blastocisto apresenta somente o trofoblasto, sem massa celular interna (MCI) (PRUITT, et al., 1991, WOODS et al., 2002). Somente três laboratórios obtiveram o nascimento de potros a partir da transferência de blastocistos produzidos por ICSI e cultivados *in vitro* (LI et al., 2001, GALLI et al., 2007, HINRICHS et al., 2007b). Woods et al. (2002) em procedimentos de transferência nuclear também obtiveram embriões sem MCI, em 2003 o mesmo grupo observou um aumento da viabilidade embrionária relacionado ao acréscimo em 3 e 6 vezes da concentração de cálcio no meio de cultivo. Níveis de cálcio 39 vezes maiores foram obtidos no fluido folicular de éguas quando comparado ao de vacas (WHITE et al., 2004). Apesar dos indícios, Hinrichs et al. (2007b), observaram que o acréscimo de cálcio ao meio de cultivo (1,8mM para 4,9mM) piorou (13% versus 23% para o controle) as taxas de produção de blastocistos produzidos por meio de ICSI e 80% dos embriões cultivados em alto cálcio demonstravam sinais de degeneração. As diferenças nos resultados obtidos por Woods et al. (2003) e Hinrichs et al. (2007b) estão relacionadas principalmente as diferentes metodologias utilizadas, Woods e colaboradores realizaram transferência nuclear e provavelmente os meios com alta concentração de cálcio podem ter afetado principalmente a ativação artificial (ionomicina + cicloheximide), onde maior quantidade de cálcio pode ter sido transportada para dentro da célula durante a ação da ionomicina, e talvez este tenha sido o maior fator correlacionado ao aumento da viabilidade dos embriões produzidos (WOODS et al., 2003). Nos resultados do presente experimento não houve diferença significativa entre as taxas de ativação e clivagem de ovócitos eqüinos quando foram comparadas altas e baixas concentrações de cálcio dentro do mesmo protocolo de ativação artificial.

Quando foi avaliado o efeito de duas concentrações de cálcio sobre as taxas de ativação artificial de ovócitos bovinos, diferente de outros pesquisadores, para os quais o cultivo de ovócitos bovinos em meio de ativação com estrôncio, sem a presença de cálcio e magnésio foi benéfica para

a taxa de descondensação da cromatina quando comparado a meios com 10mM de cálcio (34,4% versus 6,5% respectivamente) (BOS-MIKICH et al., 1995), os resultados do presente experimento apresentaram diferenças significativas, indicando que o alto cálcio foi benéfico para os grupos ionomina + cicloheximide (65,12% versus 34,78%) e ionomicina + estrôncio (40, 82% versus 19,05%). Segundo Bos-Mikich et al. (1995) os níveis baixos de cálcio e magnésio teriam um efeito benéfico sobre a diminuição da síntese protéica descrita em ratos após a redução das concentrações de cálcio e magnésio do meio de cultivo.

É possível que diferenças espécie específicas na sensibilidade de receptores IP3 e a qualidade ovócitos maturados *in vitro* possam contribuir, ao menos em parte, a baixa resposta de ovócitos eqüinos aos tratamentos de ativação artificial (BEDFORD et al., 2003).

O período ideal de maturação *in vitro* para que os ovócitos eqüinos se tornem totalmente competentes ainda é desconhecido. Estudos demonstraram que ovócitos em MI, apresentam baixa resposta ao aumento de cálcio durante a ativação artificial (SHIRAISHI et al., 1995, JONES e NIXON, 2000). Em outras espécies existem alterações na distribuição e sensibilidade dos receptores IP3 durante a maturação ovocitária (SHIRAISHI et al., 1995; FISSORI et al., 1999). A direta exposição dos cromossomos no citoplasma é importante para a reprogramação da cromatina e conseqüente desenvolvimento embrionário (WAKAYAMA e YANAGIMACHI, 2001a). Altos níveis de MPF em ovócitos enucleados em MII induzem a quebra do envelope nuclear do núcleo transferido, resultando em condensação do cromossomo, importante para a reprogramação nuclear (COLLAS e ROLB, 1991). Estes achados corroboram com os resultados obtidos no experimento V do presente estudo, no qual independente da classificação dos ovócitos em *cumulus* compactos e expandidos, do protocolo de ativação artificial utilizado e da exposição prévia ou não ao roscovitine, o percentual de ovócitos com formação de núcleo descondensado foi significativamente maior para os ovócitos em metáfase II ( $p = 0,033$ ) quando comparados aos em metáfase I.

Muitos aspectos da reprodução em eqüinos são únicos, sendo que as metodologias desenvolvidas em roedores e outras espécies domésticas, como a fusão celular não podem ser aplicadas automaticamente (LI et al., 2002). O

uso do vírus Sendai inativado tem se mostrado benéfico a fusão celular em roedores e ovinos (MCGRATH e SOLTER, 1984; WILLADSEN, 1986), mas não em bovinos (ROLB et al., 1987), pulsos elétricos fusionaram 60-90% das células de ovinos, bovinos e suínos (WILMUT et al.; 1997; KATO et al., 1998; POLEJAEVA et al., 2000) e 20-60% em eqüinos (CHOI et al., 2001b) em procedimentos de transferência nuclear.

A mudança do potencial elétrico durante a fusão celular desestabiliza a membrana plasmática levando a alterações nos filamentos de actina (PRATHER e FIRST, 1990; KAWAHARA et al., 2002). A clivagem mitótica é dependente de uma distribuição normal dos filamentos de actina (WANG et al., 2000) que formam os anéis contrateis responsáveis pela divisão celular (CAO et al., 1990). Além disso, as fragmentações formadas pela alteração dos filamentos de actina interferem no contato célula-célula, alterando a compactação e cavitação embrionária (MINA et al., 2000). Também foram reportadas dificuldades em ovócitos suínos (KAWANO et al., 2004) e bovinos (GALLI et al., 2002) quanto à injeção da célula doadora de núcleo no espaço perivitelínico do citoplasto para a realização da fusão. Sendo assim no experimento V do presente estudo foi preconizado a injeção direta da célula doadora de núcleo no citoplasto receptor.

Altas taxas de reconstituição foram produzidas em camundongos por meio da injeção intracitoplasmática direta da célula doadora de núcleo (79 a 95%, (WAKAYAMA et al., 1998; WAKAYAMA e YANAGIMACHI, 2001b). Em eqüinos, a injeção direta por meio de Piezo drill, resultou em altas taxas de reconstituição quando comparado a eletrofusão (82% versus 20-67%, CHOI et al., 2001b e 2002a).

Quando a injeção nuclear direta é utilizada, existe a possibilidade de uma quebra incompleta da membrana plasmática da célula doadora de núcleo, associado a isso meio de cultivo e membranas também são injetadas, podendo resultar em falhas na transferência nuclear (CHOI et al., 2002a). No entanto, os resultados observados em reconstituições interespecies (fibroblasto eqüinos em citoplasto bovino) utilizando Piezo drill foram maiores (81%, CHOI et al., 2002a) quando comparados à eletrofusão (69%, HINRICHS et al., 2000). E os resultados se mantiveram nas taxas de clivagem (88% versus 41%). Baseado nestes achados fica evidente o melhor desenvolvimento inter espécies quando

comparado ao eqüino - eqüino, e corroboram com resultados previamente obtidos utilizando a eletrofusão (REGGIO et al., 2001), confirmando observações anteriores que a qualidade dos ovócitos eqüinos é um entrave para o sucesso da biotecnologia.

No presente experimento, não foi possível a utilização do Piezo drill na transferência do núcleo doador, o que pode ter resultado em baixas taxas de descondensação nuclear após a reconstituição ovocitária. Vale ressaltar que todos os resultados positivos de reconstituição em eqüinos, por meio de injeção direta, foram obtidos com a utilização do Piezo drill.

## 7 CONCLUSÕES

### Experimento I:

- A metodologia utilizada no cultivo e armazenamento de fibroblastos de eqüinos de animais adultos se mostrou eficiente;
- Ambas as metodologias de obtenção de quiescência celular (privação de soro e confluência) resultaram em altas taxas de integridade de membrana;
- A privação de soro foi mais eficiente do que a confluência na sincronização do ciclo celular, apresentando porcentagens de células em G0/G1 mais elevadas.

### Experimento II:

- O roscovitine foi eficiente na inibição da meiose por 24 horas, sincronizando o início do processo e permitindo uma melhor programação das rotinas de transferência nuclear.
- As taxas de maturação nuclear obtidas nos grupos expostos e não expostos ao roscovitine demonstram a reversibilidade da inibição meiótica promovida pela droga.

### Experimento III:

- A demecolcina foi eficiente na enucleação química e preparo de citoplastos receptores bovinos e eqüinos por TN.

### Experimento IV:

- A ativação partenogenética de ovócitos bovinos foi mais eficiente quando se utilizou a combinação de ionomicina com cicloheximide ou ionomicina com roscovitine, independente dos níveis de cálcio no meio.

- A utilização de altas concentrações de cálcio não foi benéfica para a ativação partenogenética de ovócitos bovinos e eqüinos, nas condições estudadas.
- A associação de ionomicina e roscovitine foi eficiente em induzir a ativação partenogenética de ovócitos eqüinos classificados como expandidos.
- A produção de embriões eqüinos partenogenéticos foi baixa, independente do tratamento, ressaltando a baixa competência dos ovócitos utilizados.

### **Experimento V:**

- O estágio de maturação nuclear influenciou a descondensação da cromatina do núcleo doador após a reconstituição.
- A técnica de injeção direta da célula doadora de núcleo no citoplasto receptor resultou em índices insatisfatórios de produção de embriões clonados.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ABASSI Y. A., FOLTZ K. R. Tyrosine phosphorylation of the egg receptor for sperm at fertilization. **Dev. Biol.**, v. 164, p. 430-433, 1994.

ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D. The Endoplasmic Reticulum. In: **Molecular Biology of The Cell**. – Second Edition. Garland Publishin, Inc. New York. p: 433-450 1989.

ALESSI, F.; QUARTA, S.; SAVIO, M.; RIVA, F.; ROSSI, L.; STIVALA, L. A.; SCOVASSI, A. I.; MEIJER, L.; PROSPERI, E. The cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine and roscovitine arrest human fibroblasts in G1 phase by specific inhibition of Cdk2 kinase activity. **Exp.Cell Res.**, v. 245, p. 8-18. 1998.

ALM H., HINRICHS K. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of horse oocytes and its relation to initial cumulus morphology. **J. Reprod. Fertil.**, v. 107, p. 215-202, 1996.

ALM, H., TORNER, H., BLOTTNER, S., NURNBERG, G., KANITZ, W. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. **Theriogenology**, v. 56, p. 817-829, 2001.

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

BEDFORD, S. J.; KUROKAWA, M.; HINRICHS, K.; FISSORE, R. A. Intracellular calcium oscillations and activation in horse oocytes inject with stallion sperm extracts or spermatozoa. **Reproduction**, v. 126, p. 489-499, 2003.

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

---

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p. BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

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

BEZARD, J. In vitro fertilization in the mare. In: Proceedings of the international conference on biotechnics in horse reproduction. Agricultural University of Cracow, Poland, p. 12, 1992.

BLONDIM, P.; COENEN, K.; GUIBAULT, L. A.; SIRARD, M. A.; In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v. 47, p. 1061-1075, 1997.

BOOTH P.J., VIUFF D., TAN S. Numerical chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. **Biol. Reprod.**, v. 68, p. 922-928, 2003.

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

BORDIGNON V., CLARKE H.J., SMITH L.C. Factors controlling the loss of immunoreactive somatic histone H1 from blastomere nuclei in oocyte cytoplasm: a potential marker of nuclear reprogramming. **Dev. Biol.** V. 233, p. 192-203, 2001.

BORDIGNON V., KEYSTON R., LAZARIS A. Transgene Expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from *in vitro*-transfected somatic cells. **Biol. Reprod.**, v. 68, p. 2013-2023, 2003.

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

BOS-MIKICH, A.; WOODS, M. J.; CANDY, C. J.; WHITTINGHAM, D. G. Cytogenetical analyses and developmental potential of vitrified mouse oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 53, p. 780-785, 1995.

BRIGGS R.; KING T.J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 38, p. 455-463, 1952.

CAO, L. G.; WANG, Y. L. Mechanism of the formation of contractile ring in dividing cultured animal cells. **J. Cell Biol.**, v. 111, p. 1905-1911, 1990.

CARNEIRO G. F., LORENZO P. L., PEREIRA G. R., PEGORARO C. A., PIMENTEL C. A., LIU I. K. M. Artificial activation of in vitro-matured equine oocytes with strontium chloride, thimerosal and calcium ionophore. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 94, p. 311-313, 2006.

CARNEIRO G. F., LORENZO P. L., PIMENTEL, C.; PEGORATO, L.; BERTOLINI, M.; BALL, B.; ANDERSON, G.; LIU, I. Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with maturation and parthenogenic development in equine oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 899-905, 2001.

CHAVATTE-PALMER P., HEYMAN Y., RICHARD C. Clinical, hormonal and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 1596-1603. 2002.

CHECURA C. M., PARRISH J. J. The role of calcium in maturation and activation of horse oocytes. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 94, p. 340-342, 2006.

CHO J.K., LEE B.C., PARK J.I. Development of bovine oocytes reconstructed with different donor somatic cells with or without serum starvation. **Theriogenology**, v. 57, p. 1819-1828, 2002.

CHO, S.R.; OCK, S.A.; YOO, J.G.; MOHANA KUMAR, B.; CHOE, S.Y.; RHO, G.J. Effects of confluent, roscovitine, treatment and serum starvation on the cell-cycle synchronization of bovine foetal fibroblasts. **Reprod. Dom. Anim.**, v.40, p.171-176, 2005.

CHOI Y. H., LOVE C. C., CHUNG Y. G., VARNER D. D., WESTHUSIN M. E., BURGHARDT R. C., HINRICHS K. Production of nuclear transfer horse embryos by Piezo-Driven injection of somatic cell nuclei and activation with stallion sperm cytosolic extract. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 561-567, 2002a.

CHOI Y. H., LOVE C. C., LOVE L. B., VARNER D. D., BRINSKO B., HINRICHS K. Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed sperm. **Reproduction**, v. 123, p. 455-465, 2002b.

CHOI Y. H., LOVE C. C., VARNER D. D., THOMPSON J. A., HINRICHS K. Activation of cumulus-free horse oocytes: effect of maturation medium, calcium ionophore concentration and duration of cycloheximide exposure. **Reproduction**, v. 122, p. 177-183, 2001a.

CHOI Y. H., LOVE L. B., VARNER D. D., HINRICHS K. Blastocyst development in equine oocytes with low meiotic competence after suppression of meiosis with roscovitine prior in vitro maturation. **Zygote**, v. 14, p. 1-8, 2006a.

CHOI Y. H., LOVE L. B., VARNER D. D., HINRICHS K. Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: Effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v. 66, p. 955-963, 2006b.

CHOI Y. H., LOVE L. B., VARNER D. D., HINRICHS K. Effect of holding technique and culture drop size in individual or group culture on blastocyst development after ICSI of equine oocytes with low meiotic competence. **An. Reprod. Sci.**, v. 102, p. 38-47, 2007.

CHOI Y. H., LOVE L. B., WESTHUSIN, M. E.; HINRICHS, K. Activation of equine nuclear transfer oocytes: methods and timing of treatment in relation to nuclear remodeling. **Biol. Reprod.**, v. 70, p. 46-53, 2004.

CHOI Y. H., SHIN T., LOVE C. C., BURGHARDT R. C., VARNER D. D., HINRICHS K. Effect of initial cumulus morphology and addition of cytochalasin B on fusion, activation and cleavage of horse oocytes undergoing nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 55, p. 261, 2001b.

CHOI Y H., SHIN T., LOVE C. C., JONHSON, C. A.; VARNER, D. D.; WESTHUSIN, M. E.; HINRICHS, K. Effect of co-culture with theca interna on nuclear maturation of horse oocytes with low meiotic competence, and subsequent fusion and activation rates after nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 57, p. 1005-1011, 2002c.

CIBELLI J.B., CAMPBELL K.H., SEIDEL G.E. The health profile of cloned animals. **Nat. Biotechnol.**, v. 20, p. 13-14, 2002.

CIBELLI J.B., STICE S.L., GOLUEKE P.J. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, v. 280, p. 1256-1258, 1998.

CLARKE. H. J.; MASUI, Y. The induction of reversible and irreversible chromossome descondensation by protein synthesis inhibition during meiotic maturation of mouse oocytes. **Dev. Biol.**, v. 97, p. 291-301, 1983.

COLLAS, P.; PINTO-CORREIA, C.; PONCE DE LEON, F.A.; ROBJ, J.M. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. **Biol. Reprod.**, v.46, p.501-511, 1992.

COLLAS, P.; ROBL, J. M. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 455-465, 1991.

COOK NL, SQUIRES EL, RAY BS Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. **Equine Vet. J.**, v. 15, p. 71-4. 1993.

CUTHBERTSON, K. S. R.; WHITTINGHAM, D. G.; COBBOLD, P. H. Free Ca increases in exponetial phases during mouse oocyte actiavtion. **Nature**, v. 294, p. 754-757, 1981.

De SOUSA P.A., KING T., HARKNESS L. Evaluation of gestacional deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 23-30, 2001.

DEL CAMPO, M. R.; DONOSO, X.; PARRISH, J. J.; GINTHER, O. J. Selections of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, v. 43, p. 1141-1153, 1995.

Dell AQUILA, M. E.; CHO, Y. S.; MINOIA, P. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro matured equine oocytes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1139-56, 1997a.

Dell AQUILA, M. E.; CHO, Y. S.; MINOIA, P. TRAINA, V.; LACALANDRA, G. M.; MARITATO, F.; Effects of follicular fluid supplementation of in vitro maturation médium on the fertilization and development of equine oocytes after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.**, v. 12, p. 2766-2772, 1997b.

Dell AQUILA, M. E.; DE FELICI, M., MASSARI, S., MARITATO, F., MINOIA, P. Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilization of equine oocytes matured in vitro. **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 533-540, 1999.

DOLMETSCH, R. E.; LEWIS, R. S.; GOODNOW, C. C.; HEALY, J. I. Differential activation of transcription factors induced by Ca response amplitude and duration. **Nature**, v. 386, p. 855-858, 1997.

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

FERNANDES C. B.; LIMA-NETO J. F.; MARTINS L. R.; BONESI G. L.; TSURIBE P. M.; MELO C. M.; LEAL L. S.; DORES C .B.; BLANCO I. D. P.; DERUSSI A.A.; P. PAVÃO G. D.; MARTIN I.; DEVITO L. G.; LANDIM-ALVARENGA F. C. Maturação nuclear *in vitro* de ovócitos eqüinos de acordo com a compactação das células do cumulus e da granulosa. **Ac. Sci. Vet.**, v. 34, p. 443, 2006.

FISSORI, R. A.; LONGO, F. J.; ANDERSON, E.; PARYS, J. B.; DUCIBELLA, T. Differential distribution of inositol triphosphate receptor isoforms in mouse oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 49-57, 1999.

FLAMENT, S.; BODART, J. F.; BERTOOUT, M.; BROWAYES, E.; ROUSSEAU, A.; VILAIN, J. P. Differential effects of 6DMAP, olomoucine and roscovitine on *Xenopus* oocytes and eggs. **Zygote**, v. 8, p. 3-14, 2000.

FRANZ L. C., CHOI Y. H., SQUIRES E. L., SEIDEL Jr. G. E., HINRICHS K. Effect of roscovitine on maintenance of germinal vesicle in horse oocytes, subsequent nuclear maturation, and cleavage rates after intracytoplasmic sperm injection. **Reproduction**, v. 125, p. 693-700, 2003.

FRANZ L. C.; SQUIRES, E. L.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N.; SEIDEL JR, G. E. Effects of roscovitine in maintaining meiotic arrest in equine oocytes and subsequent maturation rates after inhibition. **Theriogenology**, v. 58, p. 679-683, 2002.

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

GALLI C., COLLEONI, S., DUCHI, R., LAGUTINA, I., LAZZARI, G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 39-55, 2007.

GALLI C., DUCHI R., MOOR R.M. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. **Cloning**, v. 1, p. 161-170, 1999.

GALLI C., LAGUTINA I., CROTTI G; COLLEONI, S.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. A cloned horse born to its dan twin. **Nature**, v. 424, p. 635, 2003.

GALLI, C.; LAGUTINA, I.; VASSILIEV, I. Comparasion of microinjection (piezo – electric) and cell fusion for nuclear trnsfer success with different cell types in cattle. **Cloning Stem Cells**, v. 4, p. 189-196, 2002.

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

GIBBONS, J.; ARAT, S.; RZUCIDLO, J.; MIYOSHI, K.; WALTENBURG, R.; RESPESS, D.; VENABLE, A.; STICE, S. Enhanced survivability of cloned calves derived from Roscovitine-Treated adult somatic cells. **Biology of Reproduction**, v.66, p.895-900, 2002.

GOUGEON, A.; TESTART, J. Germinal vesicle breakdown in oocytes of human atrestic follicles during the menstrual cycle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 78, p. 389-401, 1986.

GUIGNOT, F.; BÉZARD, J.; PALMER, E. Effect of time during transport of excised mare ovaries on oocyte rate and quality after in vitro maturation. **Theriogenology**, v. 52, p. 757-766, 1999.

HAN Y.M., KANG Y.K., KOO D.B. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 59, p. 33-44, 2003.

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

HAYES, O.; RAMOS, B.; RODRIGUEZ, L.L.; AGUILAR, A.; BADÍA, T. Cell confluency is as efficient as serum starvation for inducing arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in granulose and fibroblast cells of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.181-192, 2005.

HEYMAN Y., CHACATTE-PALMER P., LEBOURHIS D. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 6-13, 2002.

HILL J.R., EDWARDS J.F., SAWYER N. Placental anomalies in a viable cloned calf. **Cloning**, v. 83, p. 83-33, 2001.

HILL J.R., ROUSSEL A.J., CIBELLI J.B. Clinical and pathological features of cloned transgenic calves and fetuses (13 cases studies). **Theriogenology**, v. 51, p. 1451-1465, 1999.

HILL J.R., SCHLAFER D.H., FISHER P.J. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 55-63, 2002.

HINRICHS, K. Equine Cloning. Texas A & M University, College Station, EUA, 2007. Apresentação ppt.

HINRICHS, K. Update on equine ICSI and cloning. **Theriogenology**. 64, p. 535-541, 2005.

HINRICHS, K. Equine cloning. **Vet. Clin. of North America: Eq Practice**. 22, 3, p. 857-866, 2006.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; CHUNG, Y. G.; VARNER, D. D. Production of horse foals via direct injection of roscovitine-treated donor cells and activation by injection of sperm extract. **Reproduction**, v. 131, p. 1063-1072, 2006b.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. H.; LOVE, L. B.; VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; WALCKENAER, B. E. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. **Biol. Reprod.**, v. 72, p. 1142-1150, 2005.

HINRICHS K., CHOI Y. H., VARNER D. D. Production of cloned horse foals using roscovitine treated donor cells and activation with sperm extract and/or ionomycin. **Reproduction**, v. 134, p. 1-8, 2007a (in press).

HINRICHS K., CHOI Y. H., VARNER D. D., HARTMAN D. L. Efficient production of cloned horse pregnancies using roscovitine-treated donor cells. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 94, p. 309-310, 2006a.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. H.; WLACKENAER, D. D.; VARNER, D. D.; HARTMAN, D. L. In vitro produced equine embryos: production of foals after transfer, assessment by differential staining and effect of medium calcium concentration during culture. **Tehriogenology**, v. 68, p. 521-529, 2007b.

HINRICHS, K., LOVE, C. C., BRINSKO, S. P., CHOI, Y. H., VARNER, D. D., In vitro fertilization of in vitro matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparasion with rates of fertilization in vivo after oviductal transfer. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 256-262, 2002a.

HINRICHS K., LOVE C. C., CHOI Y, H., VARNER D. D., WIGGINS C. N., REINOEHL C. Supression of meiosis by inhibitors of m-phase proteins in horse oocytes with low mitotic competence. **Zygote**, v. 10, p. 37-45, 2002b.

HINRICHS, K.; MARTIN, M. G.; SCHMIDT, A. L.; FRIEDMAN, P. P. Effect of follicular components on meiotic arrest and resumption in horse oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, v. 104, p. 149-156, 1995a.

HINRICHS K., SCHMIDT A. L. Meiotic competence in horse oocytes: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. **Biol. Reprod.** v. 62, p. 1402-1408, 2000.

HINRICHS K., SCHMIDT A. L., FRIEDMAN P. P., SELGRATH J. P., MARTIN M. G. In vitro maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescense microcopy. **Biol. Reprod.**, v. 48, p. 363-370, 1993.

HINRICHS K., SCHMIDT A. L., SELGRATH J. P. Activation of horse oocytes. **Biol. Reprod. Mono.**, v. 1, p. 319-324, 1995b.

HINRICHS K., SHIN T., LOVE C. C., VARNER D. D., WESTHUNSIN M. E., Comparison of bovine and equine oocytes as host cytoplasts for equine nuclear transfer. In: Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Equine Embryo Transfer. n. 3, p. 43-44, 2000.

HINRICHS K., WILLIAMS K. A. Relationship among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 377-384, 1997.

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

HOSSEINI, S. M.; HAJIAN, M.; MOULAVI, F.; SHAHVERDI, A. H.; NASR-ESFAHANI, M. H. Optimized combined electrical-chemical perthenogenetic activation for in vitro matured bovine oocytes. **An. Reprod. Sci.**, 2007 (in press).

HWANG W.S., SHIN T.Y., PARK J.I. Production of Holstein and Korean native cattle cloned by somatic cell nuclear transfer (SNT) in Korea. In: **Proceedings of the Transgenic Animal Research Conference**. 1999 (abstract).

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

ILYIN V.; PARKER I. Effects of alcohols on responses evoked by inositol triphosphate in *Xenopus* oocytes. **J. Physiol.**, v. 448, p. 339-354, 1992.

IRVINE CHG, ALEXANDER SL. The dynamics of gonadotrophin-releasing hormone, LH and FSH secretion during the spontaneous ovulatory surge of the mare as revealed by intensive sampling of pituitary venous blood. **J. Endocrinol.**, v. 140, p. 283-95. 1994.

IYER, V.R.; EISEN, M.B.; ROSS, D.T.; SCHULER, G.; MOORE, T.M.; LEE, J.C.F.; TRENT, J.M.; STAUDT, L.M.; HUDSON, J.; BOGUSKI, M.S.; LASHKARI, D.; SHALON, D.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. **Science**, v.283, p.83–87, 1999.

JAFFE L. A. First messengers at fertilization. **J. Reprod. Fertil.**, v. 42, p. 107-116, 1992.

JELLERETTE, T.; HE, C. L.; WU, H.; PARYS, J. B.; FISSORE, R. A. Down regulation of the inositol 1,4,5 triphosphate receptor in mouse eggs following fertilization or parthenogenetic activation. **Dev. Biol.** , v. 223, p. 238-250, 2000.

JENUWEIN T.; ALLIS C.D. Translating the histone code. **Science**, v. 293, p. 1074-1080, 2001.

JILEK, F.; HUTTELOVA, R.; PETR, J.; HOLUBOVA, M.; ROZINEK, J. Activation of pig oocytes using calcium ionophore effect of portein synthesis inhibitor cycloheximide. **An. Reprod. Sci.**, v. 63, p. 101-111, 2000.

JONES, K. T.; NIXON, V. L. Sperm induced Ca oscillations in mouse oocytes and eggs can be mimicked by photolysis of caged inositol 1,4,5 triphosphate: evidence to support a continuous low level production of inositol 1,4,5 triphosphate during mammalian fertilization. **Dev. Biol.**, v. 225, p. 1-12, 2000.

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

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

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

KAWAHARA, M.; MORI, T.; TANAKA, H.; SHIMIZU, H. The suppression of fragmentation by stabilization of actin filament in porcine enucleated oocytes. **Theriogenology**, v. 58, p. 1081-1095, 2002.

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

KAWANO, K.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Comparison of in vitro development of porcine nuclear transferred oocytes receiving fetal somatic cells by injection and fusion methods. **Cloning Stem Cells**, v. 6, p. 67-72, 2004.

KIM N. H., SIMERLY C., FUNAHASHI H., SCHATTEN G., DAY B. N. Microtubule organization in porcine oocytes during fertilization and parthenogenesis. **Biol. Reprod.**, v. 54, p. 1397-1404, 1996.

KLINE D.; KLINE J.T. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. **Dev. Biol.**, v. 149, p. 80-89, 1992.

KOO D.B., KANG Y.K., CHOI Y.H. Aberrant allocation of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 487-492, 2002.

KUBOTA, C.; YAMAKUCHI, H.; TODOROKI, J.; MIZOSHITA, K.; TABARA, N.; BARBER, M.; YANG, X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.97, p.990-995. 2000.

KUES, W.A.; ANGER, M.; CARNWATH, J.W.; PAUL, D.; MOTKIK, J.; NIEMANN, H. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. **Biol. Reprod.**, v.62, p.412-419, 2000.

LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; PONDERATO, N.; TURINI, P.; CROTTI, G.; GALLI, C. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. **Reproduction**, v. 130, p. 559-567, 2005.

LANDIM-ALVARENGA F.C., RUBIN M.I.B., MACLELLAN L.J. Ultrastructural analysis of in vitro matured equine oocytes cultured in different systems. **Theriogenology**, v. 58, p. 729-734, 2002.

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

LI E. Chromatin modifications and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nat. Rev. Genet.**, v. 3, p. 662-673, 2002.

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

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

LI X., MORRIS L. H. A., ALLEN W. R. Chromatin reprogramming in enucleated horse oocytes injected with cumulus cell nuclei. **J. Reprod. Fertil.** v. 25, p. 77, 2000.

LI X., MORRIS L. H. A. ALLEN W. R. In vitro development of horse oocytes reconstructed with the nuclei of fetal and adult cells. **Biol Reprod.** , v. 66, p. 1288-1292, 2002.

LI X., MORRIS L. H. A. ALLEN W. R. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Reproduction**. V. 121, p. 925-932, 2001.

LI, W.; LOPIS, J.; WHITNEY, M.; ZLOKARNIK, G.; TSIEN, R. Y. Cell permeant caged InsP3 ester shows that Ca spike frequency can optimize gene expression. **Nature**, v. 392, p. 936-941, 1998.

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.**, v. 59, p. 537-545, 1998.

LOVE, L. B.; CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. **Theriogenology**, v. 59, p. 765-774, 2003.

MARCHAL R., TOMANEK M., TERQUI M., MERMILLOD P. Effects of cell cycle dependent kinases inhibitor on nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 60, p. 65-73, 2001.

MASUI, Y.; LOHKA, M. J.; SHIBUYA, E. K. Roles of Ca ions and ooplasmic factors in the resumption of metaphase arrest meiosis in *rana pipiens* oocytes. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v. 38, p. 45-66, 1984.

MATTSON, B. A.; ALBERTINI, D. F. Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 25, p. 374-383, 1990.

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.**, v. 82-83, p. 13-20, 2004.

MEO S. C., LEAL C. L., GARCIA J. M. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 81, p. 35-46, 2004.

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

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

MCCLUE, S. J.; BLAKE, D.; CLARKE, R.; COWAN, A.; CUMMINGS, L.; FISCHER, P. M.; MACKENZIE, M.; MELVILLE, J.; STEWART, K.; WANG, S.; ZHELEV, N.; ZHELEVA, D.; LANE, D. P.; In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R roscovitine). **Int. J. Cancer.**, v. 102, p. 463-536, 2002.

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

MINA, A.; GLORIS, C.; GILES, T.; JOHN, G.; MAGDALENA, K.; JACQUES, C. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in vitro. **Hum Reprod.**, v. 15, p. 2634-2643, 2000.

MITALIPOV, S. M.; NUISSE, K. D.; WOLF, D. P. Cycloheximide induced activation of mouse eggs: effects on cdc2/cyclin B and MAP Kinase activities. **J. Cell Sci.**, v. 109, p. 739-748, 2001.

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

NURSE P.A. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. **Cell**, v. 100, p. 71-78, 2000.

PALMER, E., BEZARD, J., MAGISTRINI, M., DUCHAMP, G. In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. **J. Reprod. Fertil.**, v. 44, p. 375-384, 1991.

PARRISH, J. J.; KIM, C. I.; BAE, I. H. Current concepts of cell cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. **Theriogenology**, v. 38, p. 277-296, 1992.

PEDERSEN, H. G.; TELFER, E. E.; WATSON, E. D. Apoptosis in granulosa cells and the relation to cumulus expansion and oocyte chromatin configuration in ovarian follicles. **J. Reprod. Fertil.**, v. 56, p. 455-462, 2000.

PETERSEN, M. M.; CHOI, Y. H.; BRUCK BOGH, I.; HINRICHS, K. Incubation of equine oocytes in roscovitine before in vitro maturation: Influence of maturation time before fertilization. **An. Reprod. Sci.**, v. 94, p. 362-363, 2006.

PIMENTEL, A. M.; BRODIGNON, V.; SMITH, L. C.; Effect of meiotic resumption delay on in vitro maturation and parthenogenic development of equine oocytes. **Theriogenology**, v. 57, p. 735, 2002.

POLEJAEVA, I. A.; CHEN, S. H.; VAUGHT, T. D.; PAGE, R. L.; MULLINS, J.; BALL, S.; DAL, Y.; BOONE, J.; WALKER, S.; AYARES, D. A.; COLMAN, A.; CAMPEBELL, K. H. S. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult cells. **Nature**, v. 407, p. 86-90, 2000.

PONDERATO, N.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; TURINI, P.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Bovine oocytes treated prior to in vitro maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 60, p. 579-585, 2001.

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

PRATHER, R. S.; FIRST, N. L. Nuclear transfer in mammalian embryos. **Int. Rev. Cyt.**, v. 120, p. 169-190, 1990.

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

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

PRESICCE, G. A.; YANG, X. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured in vitro for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 37, p. 61-68, 1994.

PRUITT, J. A.; FORREST, D. W.; BURGHARDT, R. C.; EVANS, J. W.; KRAEMER, D. C. Viability and ultrastructure of equine embryos following culture in a static or dynamic system. **J. Reprod. Fertil.**, v. 44, p. 405-410, 1991.

REGGIO, B. C.; SANSINENA, M.; COCHRAN, R. A.; GUITREAU, A.; CARTER, J. A.; DENISTON, R. S.; GODKE, R. A. Nuclear transfer embryos in the horse. In: Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Equine Embryo Transfer, Saari, Finland, p. 45-46, 2001.

RENARD J.P., CHASTANT S., CHESNÉ P. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. **The Lancet**, v. 353, p. 1489-1491, 1999.

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

ROBL, J. M.; PRATHER, R.; BARNES, F.; EYESTONE, W.; NORTHEY, D.; GILLIGAN, B.; FIRST, N. L. Nuclear transplantation in bovine embryos. **J. Anim. Sci.**, v. 64, p. 642-647, 1987.

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

SARAIVA, N. Z. Efeitos da demecolcina na cinética de maturação, microtúbulos e na enucleação química de oócitos bovinos. 2007. 93f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

SCHRAMM, R. D.; TENNIER, M. T.; BOATMAN, D. E.; BAVISTER, B. D. Chromatin configurations and meiotic competence of oocytes are related to follicular diameter in nonstimulated Rhesus monkeys. **Biol. Reprod.**, v. 48, p. 349-356, 1993.

SEIDEL G.E. Cloning mammals by microsurgery to embryos. In: **Proceedings of the Second Symposium on Advanced Topics in Animal Reproduction:** 141-158, 1983.

SHIRAISHI, K.; OKADA, A.; SHIRAKAWA, H.; NAKANISHI, S.; MIKOSHIBA, K.; MIYAZAKI, S. Developmental changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5 triphosphate receptors and the spatial pattern of Ca release during maturation of hamster oocytes. **Dev. Biol.**, v. 170, p. 594-606, 1995.

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

SHIGA K., FUJITA T., HIROSE K. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. **Theriogenology**, v. 52, p. 527-535, 1999.

SHIOYA, Y.; KUWAYAMA, M. FUKUSHIMA. A In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. **Theriogenology**, v. 30, p. 489-95, 1988.

SIMERLY C., DOMINKO T., NAVARA C. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. **Science**, v. 300, p. 297, 2003.

SOLTER D. Mammalian cloning: advances and limitations. **Nat. Rev. Genet.**, v. 1, p. 199-207, 2000.

STICE, S.L.; GIBBONS, J.; RZUCIDLO, J.R.; BAILE, C.A. Improvements in nuclear transfer procedures will increase commercial utilization of animal cloning. **Asian Aust. J. Anim. Sci.**, v.13, p.856-860, 2000.

TISCHNER, M. KLIMEZAK, M. The development of Polish ponies born after embryo transfer to large recipients. **Equine Vet J.** 8, p. 62-63, 1989.

VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L.; SELTON, D. C.; TESTER, D. F.; SCHLAFER, D. H.; WHITE, K. L. Present status of equine cloning and clinical characterization of embryonic fetal, and neonatal development of three cloned mules. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v. 225, p. 1694-1699, 2004.

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

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

VIGNON X., Le BOURTHIS D., CHESNE P. Development of bovine NT embryos reconstituted with quiescent and proliferative skin fibroblasts. **Theriogenology**, v. 51, p. 216, 1999.

WAKAYAMA T., PERRY A. C. F., ZUCCOTTI, M., JOHNSON K. R., YANAGIMACHI R., Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v. 394, p. 396-374, 1998.

WAKAYAMA T., YANAGIMACHI, R. Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. **Reproduction**, v. 122, p. 49-60, 2001a.

WAKAYAMA T., YANAGIMACHI. R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 58, p. 376-383, 2001b.

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

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

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

WHITE K. L., WOODS G. L., VANDERWALL D. K., LI G. P., SESSIONS B. R., BUNCH T. D. Why clone horses and mules? **IEEE Eng. Med. Biol. Mag.** v. 23, p. 32-36, 2004.

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

WHITMORE HL, WENTWORTH BC, GINTHER OJ.. Circulating concentrations of luteinizing hormone during estrous cycle of mares as determined by radioimmunoassay. **Am. J. Vet. Res.**, v. 34, p. 631-636. 1973

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

WILMUT, I. Special method issue. **Cloning Stem Cells**, v. 5, p. 221-337, 2003.

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

WOODS, G. L.; WHITE, K. L.; VANDERWALL, D. K.; ASTON, K. I.; BUNCH, T. D.; CAMPBELL, K. D. Cloned mule pregnancies produced using nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 58, p. 779-782, 2002.

WOODS G.L., WHITE K.L., VANDERWALL D.K., LI G. P., ASTON K. I., BUNCH T. D., MEERDO L. N., PATE B. J. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. **Science**, v. 301, p. 1063, 2003.

XIHE LI, MORRIS, L. H. A.; ALLEN, W. R. Effects of different activation treatments on fertilization of horse oocytes by intracytoplasmic sperm injection. **J. Reprod. Fertil.**, v. 119, p. 253-260, 2000.

YAMAZAKI W., FERREIRA C.R., MÉO S.C. Normal offspring produced by somatic cell nuclear transfer using strontium and ionomycin as activating agents. **Theriogenology**, v. 59, p. 293, 2003.

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

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

ZHANG J. J., BOYLE M. S., ALLEN W. R., GALLI C. Recent studies on in vivo fertilization of in vitro matured horse oocytes. **Equine Vet. J.**, v. 8, 101-104, 1989.

ZIMMERMAN U.; VIENKEN J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. **J. Membrane Biol.**, v. 67, p. 165-182, 1982.