

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PATRICIA MARAFON PORCIUNCULA

**Ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens  
com ionomicina e 6-dimetilaminopurina associado ou  
não ao estrôncio**

---

Pirassununga – SP

2007

PATRICIA MARAFON PORCIUNCULA

**Ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens com  
ionomicina e 6-dimetilaminopurina associado ou não ao  
estrôncio**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

---

Pirassununga – SP

2007

**Dedico**  
à pessoa que representa o  
“Norte” da minha caminhada e o  
alicerce dos meus valores. À minha  
mãe, Alice Marafon, pelo apoio,  
amor e companheirismo em todas  
as etapas da minha vida longe de  
casa.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por abençoar minha família, meu caminho e minhas escolhas.

À **minha família**, pela confiança, pelo amor e união que desfrutamos em momentos complicados.

À **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA**, pela realização do Mestrado.

Ao professor orientador, **Dr. Flávio Vieira Meirelles**, pela orientação e pelo enorme aprendizado pessoal e científico neste tempo de convivência.

Aos professores, **Drs. Cláudia Lima Verde Leal e Júlio Balieiro**, pela amizade, paciência, disponibilidade e conhecimentos transmitidos durante todo o tempo de mestrado.

À pesquisadora e amiga **Dr.<sup>a</sup> Simone Cristina Méo Niciura**, pelos ensinamentos transmitidos, pelos conselhos e apoio científico sempre que precisei.

A todos integrantes e ex-integrantes do **Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) e Laboratório de Histologia**, pelos ensinamentos, pela ajuda no começo, no meio, no final ou o tempo todo de mestrado com a execução de técnicas, correções e em momentos difíceis. Principalmente ao **Flávio Perna Júnior**, ex-estagiário do LMMD, pelo carinho e ensinamentos de ativação partenogenética que tornaram meu estágio curricular nesta dissertação.

Ao amigo **Leonardo do Amaral (Léo)**, sempre na estrada buscando ovários para os nossos trabalhos no laboratório e por todas as vezes que pude contar contigo e com tua família.

Aos **amigos do Grupo de Melhoramento Genético (GMA) e do Laboratório de Imunologia de Parasitas** pelo carinho.

Aos funcionários da biblioteca, em especial a **Patrícia e a Bernadete** pelo carinho e auxílio prestado.

Aos funcionários da **Segurança do campus**, pelo cuidado na volta pra casa nas madrugadas de trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pelo apoio financeiro.

A todos que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

## RESUMO

PORCIUNCULA, P.M. **Ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens com ionomicina e 6-dimetilaminopurina associado ou não ao estrôncio**. 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

Tendo em vista a possibilidade da associação de agentes ativadores aliada à influência da idade do oócito no desenvolvimento embrionário, a proposta deste trabalho foi estudar a relação entre o envelhecimento do oócito e a ativação partenogenética. Para tal, oócitos bovinos foram maturados *in vitro* por um período de 22 h (jovens) e 28 h (envelhecidos). Em seguida, os dois grupos de oócitos foram ativados com os tratamentos: ID3: ionomicina (5  $\mu$ M por 5 min) + 6DMAP (2 mM por 3 h de incubação); ID6: ionomicina (5  $\mu$ M por 5 min) + 6DMAP (2 mM por 6 h de incubação); IDS: ionomicina + associação 6DMAP (2 mM) e estrôncio (20 mM; SrCl<sub>2</sub>) por 6 h e IDSS: ionomicina + (6DMAP+Sr) nas primeiras 3 h, seguido de lavagem e incubação com estrôncio (Sr<sup>2+</sup>) isoladamente por mais 3 h de incubação. O grupo controle foi cultivado na ausência de qualquer agente ativador (ativação espontânea). Após a ativação os oócitos foram avaliados quanto a: 1) taxa de ativação (formação de pronúcleo às 12 hpa); 2) atividade do fator promotor de maturação (MPF) e proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) nos intervalos de 5 min, 3 h, 6 h e 10 h; 3) desenvolvimento embrionário (taxa de clivagem às 48 h, dia 7 e 9 taxas de blastocisto e eclosão); 4) qualidade dos embriões (dia 9 pelo número total de células, apoptose e expressão de interferon- $\tau$ ). Em geral, oócitos jovens apresentaram menor taxa de ativação e maior atividade de MPF e MAPK em relação aos envelhecidos. No entanto, a incubação dos oócitos em 6DMAP por 6 h permitiu taxas semelhantes aos envelhecidos com pequeno prejuízo em número de células, sem efeitos em outros critérios de qualidade do embrião. Os dados sugerem possíveis aplicações destes resultados de maneira a contribuir para a TN com flexibilidade de horários e produção de embriões de boa qualidade.

**Palavras-chave:** oócitos, bovinos, ativação, partenogênese, qualidade, biotecnologia.

## ABSTRACT

PORCIUNCULA, P.M. **Parthenogenetic activation of young bovine oocytes with ionomycin and 6-dimethylaminopurine associated or not with strontium.** 2007. 80 f. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

Considering the possibility of the combination of different activating agents associated to the influence of oocyte ageing on embryo development, the purpose of this work to study the relationship between oocyte ageing and parthenogenetic activation. Bovine oocytes were *in vitro* matured for 22 (young) and 28 h (aged). Next, both groups of oocytes were activated using the following treatments: ID3: ionomycin (5  $\mu$ M for 5 min) + 6DMAP (2 mM for 3 h); ID6: ionomycin (5  $\mu$ M for 5 min) + 6DMAP (2 mM for 6 h); IDS: ionomycin + 6DMAP (2 mM) and strontium (20 mM; SrCl<sub>2</sub>) for 6 h and IDSS: ionomycin + (6DMAP+Sr<sup>2+</sup>) for the first 3h, followed by incubation with Sr<sup>2+</sup> alone for another 3 h. The control group was cultured in the absence of any activating agents (spontaneous activation). After activation, the oocytes were evaluated for: 1) activation rate (pronuclei formation at 12 hpa); 2) activity of maturation promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) at 5 min, 3 h, 6 h and 10 hpa; 3) embryo development (cleavage rate at 48 h and blastocyst and hatching rates on days 7 and 9); 4) embryo quality (day 9 regarding total cell numbers, apoptosis and interferon- $\tau$  expression). In general, young oocytes showed lower activation rates and higher MPF and MAPK activity when compared with aged oocytes. However, incubation of the oocytes with 6DMAP for 6 h allowed development rates similar to aged oocytes with a small decrease in total cell number, but without effects on other criteria of embryo quality. The data suggest a possible application of these results in such a way to contribute for timing flexibilization in NT experiments and production of good quality embryos.

**Keywords:** oocytes, bovine, activation, parthenogenesis, quality, biotechnology

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação do requerimento das duas cinases (MPF e MAPK) responsáveis pelo controle e pela manutenção do bloqueio meiótico durante a maturação do oócito. A fase G2 é o intervalo entre o período de síntese de DNA e a divisão celular e a fase M é o período de divisão celular ou meiose. O término dessa etapa culmina com um oócito maturo, com o 1ºCP extruído e com alta atividade de MPF e de MAPK que mantêm o bloqueio em MII.....21

**Figura 2.** Modelo esquemático da atividade das cinases MPF e MAPK no oócito de mamíferos. A atividade de ambas inicia-se basal, no oócito imaturo. Na fase de retomada da meiose, o aumento na atividade do MPF precede o da MAPK, que é independente do MPF. Após esse pico, o MPF oscila enquanto a MAPK permanece alta por todo o período meiótico. No processo de maturação, o fator citostático (CSF) estabiliza a atividade do MPF que, em altos níveis e junto com a MAPK, mantém o oócito em MII até a fecundação ou a ativação partenogenética. Com o aumento nos níveis de  $Ca^{2+}$  livre, o CSF é inativado pela MAPK, o MPF perde a estabilidade e sua atividade decai juntamente com a da MAPK. Com níveis baixos dessas cinases, o oócito é capaz de progredir para a Anáfase e a Telófase, formar os pronúcleos, iniciar a fase de mitose com a primeira clivagem e progredir no desenvolvimento.....22

**Figura 3.** Representação gráfica da taxa de ativação partenogenética (médias  $\pm$  erro padrão) entre os tratamentos utilizados em oócitos jovens e envelhecidos. Oócitos envelhecidos apresentaram maior taxa de ativação em relação aos oócitos jovens ( $71,40 \pm 3,36$  e  $57,279 \pm 3,68$ , respectivamente) com  $p=0,0078$ . Entre os agentes químicos ativadores, apenas o tratamento ionomicina + associação [6-DMAP+Sr] + estrôncio ( $Sr^{2+}$ ) utilizado no grupo 22 h, diferiu apresentando a menor taxa ( $49,282 \pm 6,38$ ), sendo inferior aos demais ( $p<0,05$ ).....41

**Figura 4.** Fotomicrografia de oócitos bovinos maturados *in vitro* por 22 h (a-c) ou 28 h (e-f), ativados partenogeneticamente com diferentes agentes químicos e corados com bisbenzimidazina (Hoechst) e analisados 12 h após a ativação. Visualização em estereomicroscópio de epifluorescência, filtro com comprimento de onda de excitação igual a 365 nm e emissão de 420 nm. **a.** Oócito no estágio de metáfase II (MII) representante do grupo tratado com ionomicina + 6DMAP (ID22), mas que não respondeu ao tratamento de ativação. **b.** Zigoto com um pronúcleo obtido pelo tratamento ionomicina + [6DMAP+estrôncio] (IDS22). **c.** Zigoto com dois pronúcleos obtido após tratamento com ionomicina + [6DMAP+estrôncio] + estrôncio (IDSS22). **e.** Oócito em MII representante do grupo ativado com ionomicina + 6DMAP (ID28), mas que não respondeu ao tratamento. **f.** Zigoto com um pronúcleo obtido pelo tratamento ionomicina + [6DMAP+estrôncio] (IDS28). **g.** Zigoto com dois pronúcleos obtido após tratamento com ionomicina + [6DMAP+estrôncio] + estrôncio (IDSS28). As setas sinalizam o pronúcleo (PN) e as cabeças de setas sinalizam o corpúsculo polar (CP).....42

**Figura 5.** Representação em gel de poliacrilamida a 15%, do ensaio da histona H1, com peso molecular aproximado de 35 KDa, marcando a atividade de MPF e da proteína MBP com peso molecular aproximado de 20,4 KDa, para MAPK.....43

**Figura 6.** Representação gráfica do comportamento da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) ao longo do período de ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens e envelhecidos.....45

**Figura 7.** Representação gráfica do comportamento do Fator Promotor de Maturação (MPF) ao longo do período de ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens e envelhecidos.....46

**Figura 8.** Atividade do MPF representada em cada tratamento utilizado para ativar oócitos bovinos jovens. **A.** Representação em gel, onde a análise foi realizada por densitometria de bandas, cada amostra continha um pool de 4 oócitos. **B.** Representação gráfica ao longo dos intervalos em horas durante o período de ativação partenogenética. Os tratamentos não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ) durante as 10 h primeiras horas analisadas. A diferença gráfica não é representativa de restabelecimento na atividade do MPF uma vez que se houve formação de pronúcleo as 12 h pós-ativação como foi comprovado no experimento 1. Como se trata de um pool, um oócito que não tenha respondido ao processo de ativação de maneira eficiente pode ter sido responsável por aumento aparente na atividade, mas que não interferiu em taxas de desenvolvimento embrionário com nível de significância de 5%.....47

**Figura 9.** Atividade da MAPK representada em cada tratamento utilizado para ativar oócitos bovinos jovens. **A.** Representação em gel, onde a análise foi realizada por densitometria de bandas, cada amostra continha um pool de 4 oócitos. **B.** Representação gráfica ao longo dos intervalos em horas durante o período de ativação partenogenética. Os tratamentos não diferiram entre si ( $p < 0,05$ ) durante as 10 h primeiras horas analisadas. A diferença gráfica não é representativa de restabelecimento na atividade do MPF uma vez que se houve formação de pronúcleos as 12 hpa como foi comprovado no experimento 1. Como se trata de pool, existe a possibilidade de um oócito que não tenha respondido ao processo de ativação de maneira eficiente, ser responsável pelo aumento aparente na atividade nos períodos entre 3 h e 6 h, mas que não interferiu em taxas de desenvolvimento embrionário com nível de significância de 5%.....48

**Figura 10.** Relação entre os tratamentos ativadores utilizados em oócitos bovinos jovens e envelhecidos e a qualidade estimada pelo número de células, dos embriões produzidos. Os grupos ionomicina + 6DMAP (ID/6h) por 6 h usado na ativação de oócitos jovens e ionomicina + [6DMAP+Sr] nas primeiras três horas + Sr por mais 3 h (IDSS) usado na ativação de oócitos envelhecidos apresentaram médias de número total de células inferiores quando comparados aos demais grupos ( $p < 0,05$ ).....52

**Figura 11.** Fotomicrografia de epifluorescência de embriões partenogeneticos ao nono dia de cultivo, produtos da ativação partenogenética de oócitos bovinos



maturados *in vitro* por 22 h (jovens) e/ou 28 h (envelhecidos) submetidos a tratamentos ativadores diferentes. Coluna da esquerda: coloração com Hoechst 33342, coluna da direita coloração com Isotiocianato de fluoresceína – FITC. a. Controle negativo. b. Controle positivo. c. Tratamento Ionomicina + 6DMAP – (ID22) utilizado na ativação de oócitos jovens.....55

**Figura 12.** Fotomicrografia de epifluorescência de embriões partenogenéticos ao nono dia de cultivo, produtos da ativação partenogenética de oócitos bovinos maturados por 22 h (jovens) e 28 h (envelhecidos) submetidos a tratamentos ativadores diferentes. Coluna da esquerda: coloração com Hoechst, coluna da direita coloração verde com Isotiocianato de fluoresceína (FITC). d. Tratamento Ionomicina + (6DMAP+Sr) utilizado em oócitos jovens (IDS22). e. Tratamento Ionomicina + 6DMAP utilizado em oócitos envelhecidos (ID28). f. Tratamento Ionomicina + (6DMAP+Sr) utilizado em oócitos envelhecidos (IDS28).....56

**Figura 13.** Fotomicrografia de epifluorescência de embriões partenogenéticos ao nono dia de cultivo, produtos da ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens e envelhecidos submetidos ao tratamento com 6DMAP sozinho e associado ao  $Sr^{2+}$ . Coluna da esquerda: coloração azul, com Hoechst 33342, coluna do meio, coloração vermelha com Rodamina e coluna da direita sobreposição de ambas. De cima para baixo foram formados trios para os grupos avaliados: controle negativo e os quatro tratamentos como controles positivos 1. Controle negativo, onde uma massa vermelha sem pontuação é característica. 2. Tratamento ionomicina + 6DMAP (ID22) na ativação de oócitos jovens, a positividade ficou pontualmente marcada. 3. Tratamento Ionomicina + [6DMAP+Sr] (IDS22) utilizado na ativação de oócitos jovens, positivamente marcado com pontos vermelhos definidos. 4. Tratamento ionomicina + 6DMAP (ID28) na ativação de oócitos envelhecidos, positivo. 5. Tratamento Ionomicina + [6DMAP+Sr] (IDS28) utilizado na ativação de oócitos envelhecidos, também positivo a presença da caspase 3 ativa.....58

**Figura 14.** Exemplo de análise da curva de eficiência para cada poço individual através do software “LinRegPCR”, onde as linhas azuis horizontais do gráfico superior indicam intervalo analisado da curva de amplificação em sua fase exponencial, e o gráfico inferior mostra as eficiências calculadas.....61

**Figura 15.** Exemplo de análise realizada no programa “7500 System SDS Software” com a ilustração do “threshold” calculado (linha verde). Amplificação relativa do gene do IFN- $\tau$  em relação ao GAPDH ou gene endógeno.....61

**Figura 16.** Distribuição dos dados normalizados para IFN- $\tau$  em blastocistos eclodidos bovinos partenogenéticos, ativados com tempo de maturação de 22 h e 28 h com os tratamentos: Ionomicina + 6DMAP 22h (ID22); Ionomicina + 6DMAP + estrôncio 22 h (IDSr22); Ionomicina + 6DMAP 28 h (ID28); Ionomicina + 6DMAP + estrôncio (IDS28). Cada ponto representa pool de seis blastocistos eclodidos, coletados no nono dia de cultivo embrionário. A seta localiza a linha das médias normalizadas em função do logaritmo da expressão relativa do gene interferon-tau em cada tratamento avaliado.....62

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Seqüência dos primers e sondas utilizadas no experimento de expressão do gene Interferon-tau em embriões partenogenéticos bovinos no estágio de blastocisto eclodido.....38
- Tabela 2.** Taxa de ativação (média  $\pm$  erro padrão) de oócitos bovinos jovens (22 h) e envelhecidos (28 h) após tratamentos ativadores.....40
- Tabela 3.** Atividade média em densidade integrada (unidades arbitrárias) da MAPK ao longo do período de ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens e envelhecidos.....44
- Tabela 4.** Atividade média em densidade integrada (unidades arbitrárias) do Fator Promotor de Maturação ao longo do período de ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens e envelhecidos.....45
- Tabela 5.** Desenvolvimento embrionário de oócito bovinos jovens e envelhecidos ativados com diferentes tratamentos.....50
- Tabela 6.** Comparativo entre as idades ou tempo de maturação *in vitro* e o efeito de cada tratamento refletido na qualidade dos embriões produzidos, pelo número total de células.....51
- Tabela 7.** Fragmentação nuclear estimada pela técnica de TUNEL em embriões partenogenéticos bovinos analisados no 9º dia de cultivo.....54
- Tabela 8.** Presença da Caspase-3 ativa em embriões partenogenéticos bovinos ao nono dia de cultivo, oriundos de oócitos jovens e envelhecidos ativados com diferentes tratamentos.....57
- Tabela 9.** Expressão Relativa de IFN- $\tau$  em embriões partenogenéticos quantificada por PCR em tempo real (PCR-RT).....60

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

|                  |  |
|------------------|--|
| AI               | Anáfase da meiose I                            |
| AMPC             | Monofosfato de adenosina cíclico               |
| BSA              | Albumina sérica bovina                         |
| BI               | Blastocisto                                    |
| Be               | Blastocisto eclodido                           |
| Bx               | Blastocisto expandido                          |
| Ca <sup>2+</sup> | Cálcio   |
| CAD              | DNase ativada por caspase                      |
| CB               | Citocalasina B                                 |
| COC              | Complexo cumulus-oócito                        |
| CDK              | Cinase dependente de ciclina                   |
| CIV              | Cultivo embrionário <i>in vitro</i>            |
| CP               | Corpúsculo Polar                               |
| DEPC             | Dietil pirocarbonato                           |
| 6-DMAP           | 6-dimetilaminopurina                           |
| DNA              | Ácido desoxirribonucléico                      |
| DNAc             | Ácido desoxirribonucléico de fita complementar |
| FAS              | Fator de necrose tumoral                       |
| FITC             | Isotiocianato de fluoresceína                  |
| FIV              | Fecundação <i>in vitro</i>                     |
| GAPDH            | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase          |
| h                | Horas  |
| hpa              | Horas após a ativação                          |
| I                | Ionomicina                                     |
| ICAD             | Inibidor de caspase ativado por DNase          |
| IFN- $\tau$      | Interferon - Tau                               |
| IP3              | Inositol trifosfato                            |
| MAPK             | Proteína cinase ativada por mitógeno           |
| MBP              | Proteína básica de mielina                     |
| MCP              | Morte celular programada                       |

|                |   |
|----------------|---|
| MI             | Metáfase da meiose I  |
| MII            | Metáfase da meiose II   |
| Min            | Minutos   |
| MIV            | Maturação <i>in vitro</i>   |
| MPF            | Fator promotor de metáfase, de maturação ou de fase-M               |
| mL             | Mililitros  |
| $\mu$ L        | Microlitros   |
| $\mu$ g        | Microgramas   |
| nm             | Nanômetros  |
| PBS            | Salina tamponada com fosfato  |
| PCR            | Reação em cadeia da polimerase                                      |
| PIV            | Produção <i>in vitro</i> de embriões                                |
| PN             | Pronúcleo   |
| PVP            | Polivinil-pirrolidona   |
| RT-PCR         | Transcrição reversa seguida por PCR                                 |
| RNA            | Ácido ribonucléico  |
| mRNA           | Ácido ribonucléico mensageiro                                       |
| RVG            | Rompimento da vesícula germinativa                                  |
| SDS            | Dodecil sulfato de sódio  |
| SFB            | Soro fetal bovino   |
| $Sr^{2+}$ ou S | Estrôncio   |
| $SrCl_2$       | Cloreto de estrôncio  |
| TI             | Telófase da meiose I  |
| TN             | Transferência nuclear   |
| TNCS           | Transferência nuclear de célula somática                            |
| TUNEL          | <i>Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling</i> |
| VG             | Vesícula germinativa  |
| ZP             | Zona pelúcida   |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>3. HIPÓTESES.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>   | <b>28</b> |
| 4.1. Objetivo Geral.....   | 28        |
| 4.2. Objetivos Específicos.....  | 28        |
| <b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>   | <b>29</b> |
| 5.1. Local do experimento.....   | 29        |
| 5.2. Coleta dos ovários .....  | 29        |
| 5.3. Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....  | 29        |
| 5.4. Ativação Partenogenética (Ativação oocitária <i>in vitro</i> ) .....                                      | 30        |
| 5.5. Cultivo embrionário <i>in vitro</i> .....   | 30        |
| 5.6. Delineamento Experimental .....   | 31        |
| 5.6.1. Experimento 1- Taxa de Ativação .....   | 31        |
| 5.6.2. Experimento 2 - Fator Promotor de Maturação (MPF) e Proteína Cinase<br>Ativada por Mitógeno (MAPK)..... | 31        |
| 5.6.3. Experimento 3. Desenvolvimento Embrionário .....  | 33        |
| 5.6.4. Experimento 4 - Qualidade dos Embriões Produzidos .....   | 34        |
| 5.6.5. Experimento 5 - Técnica de TUNEL.....   | 34        |
| 5.6.6. Experimento 6 - Caspase-3 Ativa.....  | 36        |
| 5.6.7. Experimento 7 - Expressão de Interferon-Tau (IFN- $\tau$ ) em Embriões<br>Partenogenéticos .....        | 37        |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>7. RESUMO DOS RESULTADOS .....</b>  | <b>63</b> |
| <b>8. DISCUSSÃO .....</b>  | <b>64</b> |
| <b>9. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>71</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

No contexto mundial, a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos na Ásia e na América do Sul possui grande destaque. No ano de 2003, o número total de embriões fecundados *in vitro* produzidos no mundo ultrapassou 100.000. Na América do Sul, com grande participação do Brasil, mais de 60.000 embriões foram produzidos e transferidos a fresco (THIEBIER, 2004). Aumentar os índices de produção e obter rebanhos com material genético superior são dois dos principais objetivos da pecuária brasileira e, para tal, o uso de biotecnologias ligadas à reprodução animal torna-se a cada dia mais importante.

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

Desde o relato do nascimento da ovelha Dolly (WILMUT et al., 1997), a clonagem passou a ser uma das biotécnicas mais discutidas e estudadas, tanto pela comunidade científica como pela indústria. No final da década de 90, muitos laboratórios começaram a aplicar essa biotécnica com sucesso para produzir clones de diversas espécies. Até 2005, a estimativa mundial era de aproximadamente 1.500 animais nascidos (HEYMAN, 2005) e a bovinocultura responde pela maioria dos clones produzidos comercialmente. No Brasil, aproximadamente 28 animais das raças Nelore, Holandesa, Simental, Junqueira e mestiços foram produzidos por transferência nuclear de célula somática (TNCS) e estão vivos (MEIRELLES et al., 2006).

O método mais utilizado na clonagem animal, a TNCS, consiste na introdução mediante fusão de uma célula somática no citoplasma de um oócito enucleado. Os resultados da TNCS ainda são baixos, as taxas de gestação são variáveis e a viabilidade dos animais nascidos é reduzida (GALLI et al., 2003; MEIRELLES et al., 2006; PANARACE et al., 2007). Assim, o sucesso da clonagem depende de várias etapas que possuem reflexo direto no resultado final.

Sabe-se que para uma célula somática dar origem a um embrião viável é necessário que ocorra remodelação da cromatina e reprogramação nuclear. As instruções necessárias para o início das primeiras divisões zigóticas e para a ativação do genoma embrionário estão contidas no oócito (SIRARD, 2001) e, por isso, são influenciadas pela qualidade desse gameta. Além das outras etapas, a ativação partenogenética dos oócitos receptores de núcleo também possui importância para a TNCS (MÉO, 2004) e vem sendo foco de estudos em diversas espécies no mundo inteiro. As principais limitações da técnica de ativação são: a idade ou o tempo de maturação *in vitro* do oócito e a eficiência dos agentes ativadores utilizados. Em bovinos, a ativação de oócitos jovens é laboriosa e, muitas vezes, não atinge resultados satisfatórios, enquanto, o processo de envelhecimento melhora as taxas de ativação, mas compromete o desenvolvimento.

Tendo em vista a possibilidade da associação de agentes ativadores aliada à influência da idade do oócito no desenvolvimento embrionário e na ocorrência da morte celular programada, a proposta deste trabalho foi melhor estudar a relação entre a ativação partenogenética e a morte celular programada em oócitos bovinos visando aumentar as taxas de desenvolvimento embrionário quando aplicadas para a transferência nuclear.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. MATURAÇÃO DO OÓCITO

Os oócitos são derivados das células germinativas primordiais, as quais, ainda no desenvolvimento fetal, transformam-se em oogônias. Devido à alta frequência de divisões mitóticas, cerca de 2.700.000 oogônias estão presentes no ovário no dia 110 da gestação em bovinos (ERICKSON, 1966). Porém, esse número diminui, já que muitos oócitos sofrem processo degenerativo como resultado de erros genéticos ocorridos durante o *crossing over* ou de distúrbios metabólicos e/ou vasculares. Na fase fetal, alguns oócitos já iniciam a primeira prófase meiótica, passando então pelos estádios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, também denominado estádio de dictióteno ou de vesícula germinativa (VG), no qual ocorre a primeira parada da meiose (RICHARDS et al., 1980).

A maturação final do oócito ocorre no folículo ovulatório, após o pico de hormônio luteinizante (LH). Na maioria dos mamíferos, as fêmeas ovulam em metáfase II (MII) e os oócitos assim permanecem até que ocorra a ativação induzida pelo espermatozóide ou pelo estímulo artificial (KÜPKER et al., 1998). Ao longo do desenvolvimento folicular, os oócitos sofrem diversas modificações morfológicas e bioquímicas a partir da prófase I até a metáfase II. Modificações na configuração da cromatina, na distribuição das organelas citoplasmáticas e no armazenamento de mensagens e de proteínas sintetizadas são alguns dos eventos nucleares e citoplasmáticos da maturação oocitária. A maturação é responsável por tornar o oócito competente para responder à fecundação ou à ativação artificial e desenvolver-se em embrião (BREVINI GANDOLFI e GANDOLFI, 2001; ALI & SIRAD, 2005).

#### 2.1.1. Maturação Nuclear

Após o rompimento da vesícula germinativa (RVG), a maturação nuclear passa pelos estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e a metáfase II (MII), os cromossomos homólogos se separam e o ciclo do gameta progride até a extrusão do 1º corpúsculo polar (CP). Neste momento a meiose é interrompida no denominado segundo bloqueio meiótico. O reinício é uma consequência natural pela



fecundação ou artificial pela ativação partenogenética (GORDON, 1994). O tempo requerido para a maturação nuclear varia dependendo da espécie. Em bovinos o RVG ocorre de 8-12 horas, a MI de 12-15 horas, a AI e a TI de 15-18 horas e a MII de 18-22 horas após o pico de LH ou ocorre automaticamente a partir da retirada do oócito do folículo (SIRARD et al., 1989; WU et al., 1997). Com a remoção dos oócitos dos folículos ovarianos, ocorre a quebra das junções comunicantes (*gap junctions*) entre os compartimentos foliculares e um decréscimo dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) no oócito, cujo efeito é inibir a maturação nuclear em muitas espécies. O decréscimo nos níveis de AMPc no interior do oócito durante a liberação do bloqueio em prófase I, é um sinal necessário para a maturação e competência oocitária e deve, diretamente ou indiretamente ativar o Fator Promotor de Maturação, outras cinases e fosfatase (BILODEAU – GOESEELS, 2003; EYERS et al., 2005).

### 2.1.2. Maturação Citoplasmática

A maturação citoplasmática do oócito começa a partir de folículos primordiais e compreende as mudanças citoplasmáticas que ocorrem no oócito durante a transição do estágio de VG até o final da MII. O núcleo do oócito é rodeado pelas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e um pequeno complexo de Golgi, sendo possível a visualização dos nucléolos, os quais têm um importante papel na síntese de ácido ribonucléico (RNA). Nessa fase, ocorre ainda, a síntese das proteínas da zona pelúcida (VAN WEZEL e RODGERS, 1996), embora a zona pelúcida esteja morfológicamente presente somente nos oócitos dos folículos secundários, onde surgem as junções intercomunicantes (HYTTEL et al., 1997).

As modificações principais observadas durante a fase de desenvolvimento do oócito são: a) as formações das junções intercomunicantes entre o oócito e suas células somáticas circundantes, b) desenvolvimento e deslocamento do complexo de Golgi para a periferia do oócito, c) desenvolvimento do retículo endoplasmático liso e das gotas lipídicas, d) formação dos grânulos corticais e zona pelúcida, e) diferenciação da mitocôndria, f) desorganização dos centríolos, g) transcrição e proteção dos mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) maternos para a síntese de proteína do oócito e do desenvolvimento embrionário inicial (FAIR et al., 1995;

HYTTEL et al., 1997). A assincronia que ocorre *in vitro* entre a maturação citoplasmática e a nuclear compromete a fecundação e o desenvolvimento embrionário, o que contribui para a diminuição da proporção de oócitos que chegam ao estágio de blastocisto (30-40%) em relação aos que atingem a maturação nuclear ( $\pm 80\%$ ) (BLONDIN & SIRARD, 1995; BEVERS et al., 1997; HYTTEL et al., 2001).

A qualidade do oócito é um parâmetro importante que interfere nas alterações citoplasmáticas comprometendo a competência do oócito. Oócitos mantidos em bloqueio na fase de MII por um longo período de cultivo, começam a sofrer processo de envelhecimento mesmo na ausência de sinais de degeneração (KIKUCHI et al., 2000).

## 2.2. COMPETÊNCIA DO OÓCITO

A competência meiótica, ou seja, a habilidade do oócito para reiniciar a maturação nuclear é obtida no final da fase de desenvolvimento, o que não obrigatoriamente lhe garante o potencial de viabilidade ou de nascimento (ALI & SIRARD, 2005). O potencial de desenvolvimento é adquirido durante a oogênese por meio de alterações celulares e moleculares. Essas mudanças permitem que o oócito termine a meiose, sofra uma fecundação monospérmica e ultrapasse a fase de transição dos estádios iniciais de desenvolvimento até a ativação do genoma embrionário (COTICCHIO et al., 2004). Quando os oócitos reiniciam a meiose durante a maturação, tanto *in vivo* como *in vitro*, a habilidade de produzir proteínas não é afetada, porém, há perda da capacidade de transcrever (BLONDIN & SIRARD, 1995; FOULADI NASHTA et al., 1998). A plena capacidade de transcrição somente será restabelecida após a ativação do genoma embrionário, durante uma fase chamada de transição materno-zigótica (MZT), que no bovino ocorre no quarto ciclo celular entre os estádios de 8 e 16 células (BREVINI GANDOLFI & GANDOLFI, 2001).

Durante a maturação *in vivo*, os níveis de mRNA das proteínas cinases dependentes de ciclinas (CDKs, do Inglês *cyclin dependent kinases*) e de ciclina B aumentam. Provavelmente, esse é um sinal para ativar o MPF e a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) para a maturação dos oócitos nos mamíferos. Assim, mRNA da ciclina B e da CDK1 podem ser candidatos para a pesquisa de marcadores para a competência de oócitos bovinos maduros (JONES, 2004;

VIGNERON et al., 2004). Sabe-se que o ambiente folicular inibe a maturação espontânea do oócito. Esse bloqueio é mantido pela proteína G estimulatória (Gs) que atua na adenilato ciclase, enzima necessária para a síntese de nucleotídeos AMPc e mantida em altas concentrações no oócito. No momento em que os oócitos são liberados do seu ambiente folicular, essa atividade é perdida e o processo de maturação é iniciado (MEHLMANN et al., 2002).

Os eventos citoplasmáticos envolvidos na maturação e a sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática são essenciais para o oócito tornar-se competente. Outro fator importante na aquisição da competência é o tamanho tanto do folículo quanto do oócito, uma vez que oócitos pequenos (<60 µm) não são competentes para reiniciar a meiose quando removidos de seus folículos por aspiração folicular e cultivados *in vitro* (JONES, 2004). Em bovinos, os oócitos atingem a completa competência meiótica com 110 µm no interior de folículos com diâmetro de 2-3 mm (FAIR et al., 1995).

### 2.3. FATOR PROMOTOR DE MATURAÇÃO OU DA FASE-M - (MPF)

A regulação do ciclo celular mitótico de células somáticas é de responsabilidade de proteínas envolvidas nos processos de fosforilação e de desfosforilação mediados por proteínas cinases e fosfatases (FAN & SUN, 2004).

O fator promotor de maturação (MPF, do Inglês *maturation promoting factor*), a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK, do Inglês *mitogen activated protein kinase*) e outras cinases dependentes de ciclinas (CDKs) são as chaves moleculares para a progressão do ciclo celular durante a mitose e a meiose. O MPF é uma proteína cinase envolvida na regulação da transição da fase G2 para a fase M no ciclo celular de eucariotos. Esse fator é um heterodímero composto por duas subunidades, uma regulatória a ciclina B (45KD) e outra catalítica a p34<sup>cdc2</sup> (34KD). A p34<sup>cdc2</sup> é sintetizada constantemente, enquanto a ciclina B é degradada ciclicamente. A regulação da atividade do MPF é dependente da associação de ambas as subunidades e do estado de fosforilação. Para o MPF ser ativado, a treonina-14 (T14) e a tirosina-15 (Y15) da subunidade catalítica devem ser desfosforiladas pela enzima fosfatase cdc25 (aumenta atividade da CDK) que também se torna ativa por fosforilação (MALLER, 1994; KIKUCHI et al., 2000; TIAN

et al., 2002). Os oócitos em fase de crescimento têm menores níveis de p34<sup>cdc2</sup> e não podem progredir da fase G2 à M, porém, no fim da fase de crescimento há grande aumento na concentração da p34<sup>cdc2</sup> para a aquisição da competência meiótica (KIKUCHI et al., 2000). Em bovinos foi reportado padrão de ativação do MPF por fosforilação do substrato histona H1 pela p34<sup>cdc2</sup> após estímulo com cálcio (Ca<sup>2+</sup>; COLLAS et al., 1993). Em geral a p34<sup>cdc2</sup> é ativada no citoplasma, mas depende da translocação para o núcleo para ter efeito biológico na progressão do ciclo celular. Alternativamente, um fator nuclear, a cinase Wee1, envolvido principalmente no controle da entrada na mitose, inibe a atividade das CDKs e, por desfosforilação, pode inativar o MPF. Inativo e com um estoque armazenado de ciclina B<sup>cdc2</sup> na fase G2, o fator promotor de maturação é chamado de “pré-MPF”. Essa inatividade é mantida pela inibição da fosforilação na extremidade T-14 e Y-15 da ciclina B<sup>cdc2</sup>. Durante a prófase, o pré-MPF está localizado no citoplasma (PINES e HUNTER, 1991) e é translocado para o núcleo imediatamente após o rompimento da membrana nuclear, momento que coincide com a conversão para a sua forma ativa. Portanto, nessa etapa, a ativação do MPF é dependente da desfosforilação da tirosina e da treonina pela fosfatase cdc25. Imediatamente antes da entrada na fase-M, a cinase Wee1 é inativada, a maquinaria mitótica é exposta para ativação do MPF e ocorre a transição da fase G2 para a fase M, ou seja, a transição do estágio de síntese de DNA para a fase de divisão celular (BOGLIOLO et al., 2000).

Nos oócitos mamíferos, o MPF possui menor atividade (atividade basal) no estágio de VG, e aumenta gradualmente com o reinício da meiose até atingir seu pico no estágio de MI. Depois dessa fase, a atividade do MPF apresenta diminuição significativa que coincide com a fase de AI e a TI, seguida de novo aumento de atividade em MII e manutenção por várias horas durante a maturação do oócito, até que ocorra a fecundação ou a ativação artificial (WU et al., 1997). Em oócitos bovinos, a síntese de ciclina B ocorre antes do RVG e durante a ativação do MPF. Acredita-se que na espécie bovina, o processo de RVG possa ocorrer sem que o MPF e a MAPK estejam completamente ativos (KRISCHEK & BURKHARD, 2002). O mecanismo para a inativação do MPF envolve aumento na concentração do íon cálcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular, o qual desencadeia a proteólise da ciclina B, mediada pela ubiquitina, a desfosforilação da p34<sup>cdc2</sup> e a inativação do fator citostático (CSF). Esse fator está envolvido no bloqueio da meiose e no controle da regulação do Ca<sup>2+</sup>. O CSF é composto de MAPK e c-Mos proto-oncogene (Mos cinase). Mos é uma

serina/treonina cinase encontrada somente no estágio de MII em oócitos bovinos e é um ativador de MAPK (BORDIGNON & SMITH, 2002) .

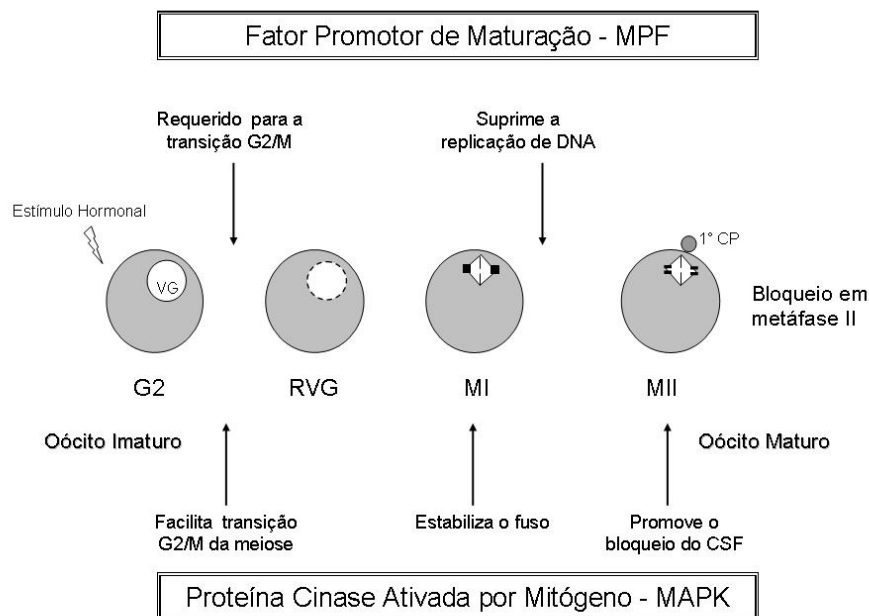
A cinética da ativação e da degradação do MPF durante a meiose já foi documentada na maioria das espécies mamíferas incluindo camundongos (CHOI et al., 1991), bovinos (ABRIEU et al., 2001) e suínos (KIKUCHI et al., 1995), mas não em ovinos (BOGLIOLO et al., 2000). Outro principal sistema regulador que funciona paralelamente e interage com o MPF na maturação e na ativação do oócito é a cascata da MAPK (Figuras 1 e 2).

#### 2.4. PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR MITÓGENO (MAPK)

Durante a divisão celular, a MAPK está envolvida na regulação da dinâmica dos microtúbulos, especialmente na manutenção e organização da MII no oócito (ALBERTS et al., 1994). Juntamente com ciclina B<sup>cdc2</sup> regula a separação dos cromossomos homólogos durante a transição entre meiose I para meiose II e, ao mesmo tempo suprimem a replicação de DNA. Também chamada de regulador extracelular de cinase (ERK, do inglês *extracellular regulated kinase*), é composta por duas isoformas ERK1 (p44) e ERK2 (p42) ambas com papel importante na meiose e amplamente expressas em oócitos mamíferos. Para tornarem-se totalmente ativas, requerem dupla fosforilação nas extremidades ou nos resíduos de tirosina e treonina. A ERK1 é o ativador direto da MAPK (FAN & SUN, 2004). Semelhante ao MPF a atividade da MAPK sofre mudanças durante a maturação. Entretanto, a ativação da MAPK não é requerida para iniciar a ativação do MPF em espécies como o camundongo por exemplo, em outras, a MAPK é ativada antes do RVG e estimula tal evento (GROSS et al., 2000). Uma possível função desta cinase, na transição da fase G2 para a fase M, é prevenir a fosforilação inibitória das cinases dependentes de ciclina, como a CDK ou cdc2. A MAPK controla a atividade da ciclina B<sup>cdc2</sup> e depende desta para a sua completa ativação.

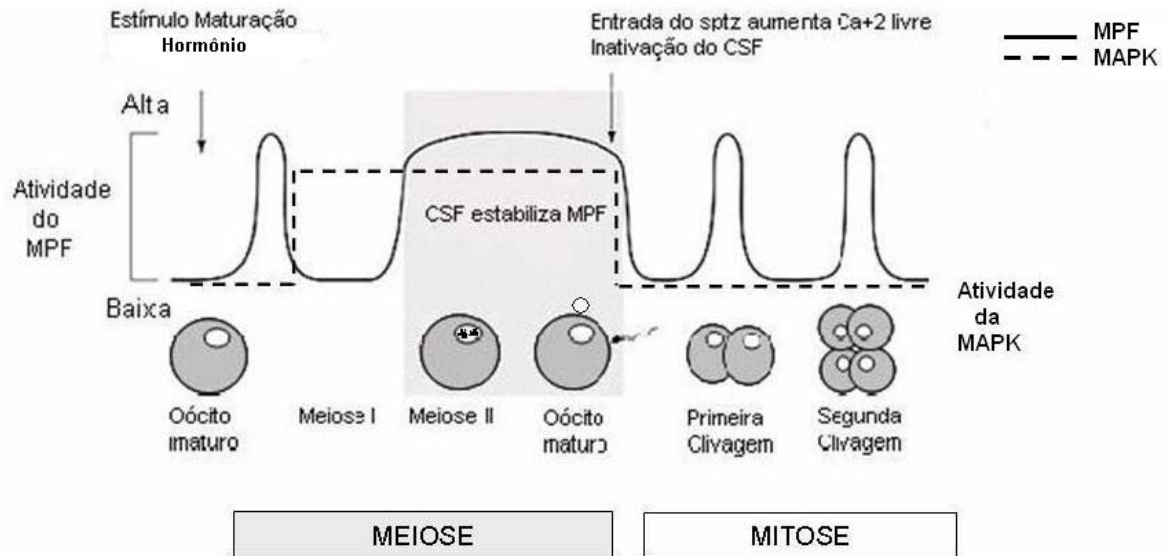
Níveis elevados das duas cinases (MPF e MAPK) na segunda divisão celular, sustentam o oócito bloqueado em MII. A subsequente ativação oocitária induzida pela fecundação ou ativação, causa queda abrupta na concentração de ambas cinases, e conduz da conclusão da segunda metáfase meiótica para a primeira divisão mitótica (Figura 2). A perda de atividade da MAPK durante a ativação do

oócito é consumada pela desfosforilação da ERK2. No bovino, a MAPK é ativada no estágio de RVG, tem sua atividade máxima em MI e decai até a formação dos pró-nucleos. *In vitro*, a inativação desta cinase, requer altos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  livre para liberar os oócitos do bloqueio, o que acontece fisiologicamente na fecundação. O principal papel da MAPK na maturação parece ser o controle nos níveis das ciclinas tipo B, principalmente a ciclina  $\text{B}^{\text{cdc}2}$  por ser responsável pela prevenção da replicação de DNA entre a 1ª e 2ª divisões meióticas, uma condição necessária para manter a diploidia (ABRIEU et al., 2001).



Fonte: Journal of Cell Science - modelo adaptado de Abrieu et al., 2001

**Figura 1.** Representação do requerimento das duas cinases (MPF e MAPK) responsáveis pelo controle e pela manutenção do bloqueio meiótico durante a maturação do oócito. A fase G2 é o intervalo entre o período de síntese de DNA e a divisão celular e a fase M é o período de divisão celular ou meiose. O término dessa etapa culmina com um oócito maduro, com o 1°CP extruído e com alta atividade de MPF e de MAPK que mantêm o bloqueio em MII.



Fonte: Journal of Cell Science - modelo adaptado de ABRIEU et al., 2001.

**Figura 2.** Modelo esquemático da atividade das cinases MPF e MAPK no oócito de mamíferos. A atividade de ambas inicia-se basal, no oócito imaturo. Na fase de retomada da meiose, o aumento na atividade do MPF precede o da MAPK, que é independente do MPF. Após esse pico, o MPF oscila enquanto a MAPK permanece alta por todo o período meiótico. No processo de maturação, o fator citostático (CSF) estabiliza a atividade do MPF que, em altos níveis e junto com a MAPK, mantém o oócito em MII até a fecundação ou a ativação partenogenética. Com o aumento nos níveis de Ca<sup>2+</sup> livre, o CSF é inativado pela MAPK, o MPF perde a estabilidade e sua atividade decai juntamente com a da MAPK. Com níveis baixos dessas cinases, o oócito é capaz de progredir para a Anáfase e a Telófase, formar os pronúcleos, iniciar a fase de mitose com a primeira clivagem e progredir no desenvolvimento.

## 2.5. ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

A partenogênese é definida como a produção de um embrião, com ou sem eventual desenvolvimento de um indivíduo, a partir de um gameta feminino na ausência da contribuição do gameta masculino (BEATTY, 1957).

Após a ovulação, os oócitos de mamíferos têm pouco tempo para serem ativados, seja naturalmente (pela fecundação) ou artificialmente (pela ativação partenogenética). Em camundongos, os oócitos têm habilidade para receber um gameta masculino em um intervalo entre 4 h e 6 h após a ovulação (GORDO et al., 2002). Segundo esses autores, depois desse período são observados sinais de deterioração celular e redução nas taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário. Os oócitos da maioria dos mamíferos são ovulados em metáfase II (MII) e assim permanecem até que ocorra ativação induzida pelo espermatozóide ou pelo estímulo artificial (KÜPKER et al., 1998). Uma vez ultrapassado o bloqueio meiótico, o oócito terá a continuidade do seu desenvolvimento, caso contrário o oócito se direciona para a degeneração (SIRARD et al., 1989). O espermatozóide é o ativador natural dos oócitos e sua penetração induz picos intracelulares de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). As oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  podem promover a inativação do MPF e do fator citostático (CSF; COLLAS et al., 1993). O decréscimo da atividade do MPF é necessário para o oócito sair do bloqueio em MII. Em oócitos envelhecidos, ocorre decréscimo gradual e espontâneo do MPF e a sensibilidade do oócito e a resposta aos agentes ativadores aumenta (WU et al., 1997; KIKUCHI et al., 2000).

No processo de fecundação e ativação do oócito, quando ocorre fusão do espermatozóide e da membrana plasmática do oócito, uma cascata de eventos é desencadeada e culmina com a formação do inositol trifosfato (IP3), cuja principal função é levar estímulos de liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  estocado no retículo endoplasmático (WHITE & YUE, 1996; ALBERTS et al., 2002; HAJNÓCZKY et al., 2003). O significado biológico das oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  não é bem conhecido, mas se sabe que os íons  $\text{Ca}^{2+}$  estão envolvidos na excitação dos grânulos corticais e no controle da progressão do ciclo celular (KLINE & KLINE, 1990; MIYAZAKI, 1990; GRUPEN et al., 2002).

O envelhecimento do oócito facilita a resposta à ativação, mas compromete o desenvolvimento embrionário, pois, além da diminuição do MPF, ocorre degradação da reserva de mRNA e proteínas maternas (COLLAS et al., 1993, 1995; ALBERTINI,



2003). Um único estímulo pode ser capaz de inativar o MPF, o que implica na retomada da meiose, extrusão do segundo corpúsculo polar e formação dos pronúcleos. Existem diversas falhas no processo de indução da ativação. Entre elas, pode-se citar a dependência do tempo de maturação ou idade dos oócitos (BARNES et al., 1993). A maior limitação de agentes físicos ou químicos é provocar a ativação partenogenética de oócitos jovens. Quando o estímulo é insuficiente, não ocorre inativação da MAPK e os níveis de MPF são restabelecidos (KIKUCHI et al., 2000). Conseqüentemente, os eventos posteriores, como recrutamento de mRNA, formação de pronúcleo, síntese de DNA e clivagem não ocorrem (MÉO, 2004).

## 2.6. AGENTES QUÍMICOS ATIVADORES

Na tentativa de simular artificialmente a função do espermatozóide, diversos tratamentos são utilizados para a ativação *in vitro* de oócitos bovinos, desde agentes físicos e químicos ou ainda a combinação de ambos. Como retro mencionado acredita-se que a baixa eficiência desta biotecnologia seja pela ineficácia dos agentes artificiais em reduzir a atividade do MPF, que poderia ser suprida por meio da utilização de agentes associados ou não, capazes de induzir oscilações freqüentes nos níveis de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

O estrôncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ) e a ionomicina liberam cálcio dos estoques citoplasmáticos e, com isso, aumentam os níveis de cálcio intracelular. Esses tratamentos também provocam na célula um estímulo similar ao IP3 na fecundação *in vitro*, permitindo a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  do compartimento extracelular (KLINE & KLINE, 1990; MIYAZAKI, 1990). Enquanto a ionomicina promove um único pico de  $\text{Ca}^{2+}$  no período inicial da ativação *in vitro*, sabe-se que a ação do  $\text{Sr}^{2+}$  em oócitos de camundongos é muito similar à do espermatozóide, pela seqüência de picos desencadeada. Em bovinos, o  $\text{Sr}^{2+}$  associado ou não a pulso elétrico já foi utilizado com bons resultados (MÉO, 2003), este foi o primeiro relato da eficácia dessa substância para tal finalidade no entanto, seu mecanismo de ação ainda não foi demonstrado.

O cálcio ionóforo e a ionomicina, usados sozinhos, são eficazes na ativação de oócitos envelhecidos, mas requerem a associação a outro agente para a ativação de oócitos jovens. A associação do estrôncio a um inibidor de síntese protéica, como o 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), aumenta as taxas de ativação em oócitos de ratos e

pode beneficiar programas de clonagem por transferência nuclear (ROH et al., 2003). O 6-DMAP promove inativação e previne restabelecimento do MPF, acelera a formação de pronúcleos, além de contribuir para a desorganização dos microtúbulos e inibir a extrusão do segundo corpúsculo polar, determinando a formação de um embrião diplóide (VITULO & OZIL, 1992).

## 2.7. INTERFERON-TAU (IFN- $\tau$ ) NA SOBREVIVÊNCIA DO EMBRIÃO

Entre as causas mais comuns de perdas embrionárias está a falha no desenvolvimento da placenta (HILL et al., 2002). O reconhecimento materno da gestação em ruminantes se dá pela ação de uma proteína (172 aminoácidos), produzida pelas células trofoblásticas do embrião no estágio de blastocisto, conhecida como interferon-tau (IFN- $\tau$ ). O período crítico de desenvolvimento embrionário e de reconhecimento materno, em bovinos, dura em torno de 42 dias e compreende eventos complexos desde a ativação do genoma, a secreção de interferon para a manutenção do corpo lúteo (CL) até a sinalização e o início da implantação. O IFN- $\tau$  uma vez liberado pelo trofotoderma do concepto, é responsável pela manutenção da prenhez, prevenindo a luteólise pela supressão da liberação pulsátil de PGF2 $\alpha$  endometrial, entre o 15<sup>o</sup> e o 17<sup>o</sup> dia de gestação (EALY et al., 1998; BINELLI et al., 2000; TATCHER et al., 2001; SANTOS et al., 2004).

A transcrição do gene IFN- $\tau$  bem como a secreção da proteína podem ser afetadas por fatores genéticos como: sexo e presença do genótipo paterno; ou ainda por fatores ambientais como meio e tempo de cultivo e manipulação (KUBISCH et al., 2003; JOHNSON, 2005). A transcrição do mRNA para a diferenciação inicial e funcional das células do trofoblasto é importante para que ocorra comunicação entre as células do trofotoderma do concepto e as células do endométrio para a manutenção do CL e a sobrevivência embrionária, sua presença. O sistema de cultivo e a fonte de suplementação protéica afetam a expressão do gene do IFN- $\tau$  (WRENZYCKI et al., 1999).

Por microscopia e reação em cadeia da polimerase (PCR), confirmou-se que embriões partenogenéticos produzem mais interferon-tau (IFN- $\tau$ ) que embriões produzidos *in vivo* (KIBUSCH et al., 2003).

## 2.8. MORTE CELULAR PROGRAMADA (MCP)

Apoptose é um tipo de morte celular programada caracterizada fenotipicamente pelo encolhimento ou redução de tamanho da célula, compactação da cromatina, vacuolização do citoplasma e formação de corpos apoptóticos (pequenos fragmentos) dentro da célula. Bioquimicamente é caracterizada pela fragmentação do DNA, que em humanos é mediada pelo fator de fragmentação e em camundongos pela DNase ativada por caspase, alterações mitocondriais e destruição celular controlada pela família das proteases cisteínas conhecidas como caspases (PARDO-VELEZ et al., 2007). Dependendo do estímulo, a apoptose pode ser induzida por duas vias: intrínseca, pela via da mitocôndria, ou extrínseca, pela via de receptores de fatores de necrose tumoral (TNF) ou por resposta a um estímulo externo como uma citocina. Os principais executores da apoptose são as caspases, proteases que induzem poros na membrana celular das mitocôndrias, e liberação do citocromo-c, um fator indutor de apoptose (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005). Tanto oócitos não fecundados como embriões envelhecidos exibem graus variáveis de fragmentação e morte celular. A fragmentação é resultado de alterações moleculares características da morte celular programada (MCP) ou apoptose, a qual requer a ativação de genes específicos envolvidos na execução do programa de MCP (GORDO et al., 2002; HAJNÓCZKY et al., 2003). Atualmente são conhecidas duas vias de apoptose, a primeira por estimulação dos receptores de morte que se encontram na superfície da célula e ativação das caspases e a segunda via de morte celular envolvendo a mitocôndria, que pode ser ativada por vários fatores incluindo dano no DNA, hipóxia, ausência de fatores de crescimento, além de outros. Esses estímulos promovem a liberação do citocromo c no citoplasma e resultam na ativação da cascata das caspases (BRATTON et al., 2000; GORDO et al., 2002). Segundo esses autores, as caspases são proteases que residem principalmente no citoplasma sob a forma de pró-enzimas inativas e são responsáveis pela transmissão do sinal de morte. A atividade das caspases é executar a clivagem proteolítica de muitas proteínas importantes que garantem a integridade e sobrevivência celular. Por fim, as caspases ainda ativam as endonucleases que fragmentam o DNA (SPANOS et al., 2002). Pouco se conhece sobre os sinais que desencadeiam a apoptose em embriões e os mecanismos precisos que executam e controlam o programa de apoptose. Entretanto, toda a via apoptótica parece ter

como ponto em comum a ativação da família das caspases (WASIELAK & BOGACKI, 2006).

Oócitos envelhecidos possivelmente perdem a função protetora de alguns componentes celulares presentes no citoplasma, levando o oócito à incompetência do desenvolvimento e à morte. Acredita-se que as oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$ , possam também estar envolvidas na sinalização da apoptose, especialmente quando iniciadas em oócitos envelhecidos (GORDO et al., 2002).

### 3. HIPÓTESES

1ª) A taxa de ativação partenogenética em oócitos bovinos é maior em oócitos envelhecidos (28 h de maturação), todavia o envelhecimento contribui para o aumento da frequência da ativação da morte celular programada (MCP).

2ª) A associação de duas drogas que favorecem de liberação de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular melhora a taxa de ativação partenogenética de oócitos jovens.

3ª) Fatores como o tempo de maturação *in vitro* ou idade e protocolos diferentes de ativação de oócitos bovinos interferem na qualidade dos embriões, estimada pelo número total de núcleos, pela taxa de células em MCP e pela expressão de IFN- $\tau$ .

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo Geral

- Otimizar o protocolo de ativação partenogenética visando melhorias da taxa de ativação partenogenética e do desenvolvimento embrionário em oócitos jovens.

#### 4.2. Objetivos Específicos

- Comparar diferentes ativadores para aumentar as taxas de ativação e desenvolvimento de oócitos jovens, bem como a qualidade dos embriões produzidos.
- Comparar a atividade de MPF e MAPK após a utilização de diferentes associações entre agentes ativadores em oócitos bovinos jovens e envelhecidos.
- Avaliar a relação entre ativação e envelhecimento oocitário com morte celular programada em embriões bovinos.
- Comparar a expressão relativa do gene interferon-tau (IFN- $\tau$ ) entre os tratamentos para ativação em oócitos bovinos jovens (22 h) e envelhecidos (28 h).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – Campus de Pirassununga.

### 5.2. Coleta dos ovários

Os ovários de vacas zebus ou azebuadas foram coletados em de abatedouros localizados na região de Pirassununga/SP. Folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm foram puncionados com agulha 18-G adaptada à seringa de 10 mL e os complexos cumulus-oócitos (COCs) com pelo menos três camadas de células e o oócito com citoplasma límpido e homogêneo, foram lavados com TCM-199 (Gibco bri; Grand Island, NY, EUA) tamponado com Hepes e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

### 5.3. Maturação *in vitro* (MIV)

Os oócitos foram maturados em micro gotas de 90  $\mu$ L de TCM-199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO<sub>3</sub> suplementado com 10% de SFB, 22  $\mu$ g/mL piruvato, 50  $\mu$ g/mL de gentamicina e 0,5  $\mu$ g/mL de FSH, 50  $\mu$ g/mL de LH e 1  $\mu$ g/mL de estradiol. Essas gotas foram cobertas com óleo mineral e incubadas (Sigma, St. Louis, USA) por período total de 28 h de maturação, em placa de Petri e em incubadora a 38,5°C, 5% CO<sub>2</sub> em ar e com máxima umidade. O primeiro grupo foi separado após 22 h de maturação e subdividido em quatro grupos. A placa de maturação voltou para a estufa com o restante dos oócitos. Por fim, às 28 h de maturação, o outro grupo de oócitos foi retirado e subdividido em quatro grupos da mesma forma como no grupo anterior. Neste estudo, os oócitos maturados por 22 h foram denominados “jovens” e os oócitos maturados por 28 h, “envelhecidos”. Após a maturação, todos os oócitos foram desnudados com hialuronidase (2 mg/mL) e ativados artificialmente *in vitro* (ativação partenogênica).

#### 5.4. Ativação Partenogenética (Ativação oocitária *in vitro*)

Após a maturação por 22 h (jovem) e 28 h (envelhecido), foram separados quatro grupos de oócitos em cada horário para ativação utilizando o protocolo mencionado a seguir:

- **Grupo Controle (C):** oócitos maturados e não ativados ou seja cultivados na ausência de qualquer agente ativador (ativação espontânea) ;
- **ID3:** ativados com ionomicina (Sigma, St. Louis, USA) na concentração de 5  $\mu$ M por 5 min + 6DMAP (Sigma, St. Louis, USA) na concentração de (2 mM) por 3 h de incubação;
- **ID6:** oócitos maturados por 22 h, ativados com ionomicina (Sigma, St. Louis, USA) na concentração de 5  $\mu$ M por 5 min + 6DMAP (Sigma, St. Louis, USA) na concentração de (2 mM) por 6 h de incubação; Somente oócitos jovens foram submetidos a este tratamento.
- **IDS:** ativados com ionomicina (5 $\mu$ M) por 5 min + associação 6DMAP (2 mM) e estrôncio (20 mM; SrCl<sub>2</sub>, J.T.Baker, Philipsburg, USA) (6-DMAP+Sr) por 6 h ;
- **IDSS:** ativados com ionomicina (5  $\mu$ M por 5 min) + (6DMAP+Sr) nas primeiras 3 h, seguido de lavagem e incubação com estrôncio sozinho por mais 3 h de incubação.

Esses mesmos tratamentos foram repetidos para os quatro grupos de oócitos maturados por 28 h, que constituíram os tratamentos C28; ID28; IDS28 e IDSS28.

Durante o tratamento de ativação e o cultivo embrionário, todos os grupos foram incubados em estufa à 38,5°C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Após 12 h de ativação, foi avaliada a taxa de ativação mediante a análise da formação de pronúcleos.

#### 5.5. Cultivo embrionário *in vitro*

Todos os grupos foram co-cultivados na presença de monocamada de células da granulosa, na mesma placa de maturação com meio renovado, em estufa com temperatura de 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar e mantidos durante nove dias, finalizando cada rotina com a avaliação da taxa de eclosão e com a coleta dos blastocistos eclodidos para as posteriores avaliações. O meio de cultivo utilizado foi o CR2aa

modificado (WATANABE et al., 1999) suplementado com 5 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) e 2% de SFB em gotas cobertas por óleo mineral.

## **5.6. Delineamento Experimental**

### **5.6.1. Experimento 1- Taxa de Ativação**

Após 12 h de ativação partenogenética, os oócitos foram corados com 10 µg/mL de bisbenzimidazina (Hoechst 33342) por 10 min, colocados em lâmina histológica sobre uma gota de glicerol. A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência (Axioplan 2 - ZEISS), com filtro de 365 nm de excitação e de emissão 420 nm. A análise foi realizada pela visualização e pela contagem de pronúcleos formados em cada tratamento utilizado.

#### **5.6.1.1. Análise estatística**

As taxas de ativação foram transformadas pela escala arco seno raiz das percentagens de ativação conforme recomendação de BANZATTO & KRONKA, 2006. Após as transformações os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) considerando os efeitos de tratamento, idade ou tempo de maturação e interação tratamento x idade. O procedimento utilizado foi o PROC GLM do programa Statistical Analysis System, versão 9.1.13 (SAS, 1995). Nos casos de fontes de variação significativas ( $p < 0,05$ ), foi utilizado o teste t de Student.

### **5.6.2. Experimento 2 - Fator Promotor de Maturação (MPF) e Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK)**

A avaliação do MPF e da MAPK foi realizada indiretamente por ensaio da histona 1 cinase e de proteína básica de mielina (MBP), de acordo com o método de CHRISTMANN et al., 1994; e KUBELKA et al., 2000, com pequenas modificações. Grupos de 4 oócitos foram colocados em microtubo contendo 3 µL do tampão de coleta (6,4 mM EDTA, 10 mM NaF e 100 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  em PBS) e congelados a -80°C até a execução da técnica. Após o descongelamento, foram adicionados 3 µL



do tampão de homogeneização (45 mM b-glicerofosfato, 12 mM p-nitrofenilfosfato, 20 mM MOPS; pH 7,2; 12 mM MgCl<sub>2</sub>; 12 mM EGTA; 0,1 mM EDTA; 0,8 mM DTT) e a amostra foi incubada a 37°C por 15 min. Após esse período, foram adicionados 4 µL do tampão de reação contendo 2 mg/ml de MBP; 1mg/ml de histona H1; 2,2 mM peptídeo inibidor de proteína cinase e 1,8 MBq/ml [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (166 TBq/mmol), seguida de incubação por 30 min a 37°C. A seguir, foram adicionados 9 µL de tampão de amostra dodecil sulfato de sódio (SDS - 62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8; com 2% p/v SDS; 10% v/v glicerol; 5% v/v 2-mercaptoetanol) 2X concentrado (volume final 20 ml). Para a separação da histona H1 cinase e da MBP, marcadas radioativamente com radioisótopo P32 ou [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (Amersham PB 10168 / Redivue AA 0068), as amostras foram levadas ao banho seco a 90°C por 5 min.

Após esse período, 13 µL de cada amostra foram colocados em gel de 15% policacrilamida-sódio duodecil sulfato (LAEMMLI, 1970), para eletroforese com corrente inicial de 120 V por 15 min e passando para 160V por, aproximadamente, 1 h. Após a eletroforese, o gel foi colocado em solução de secagem por 20 min sob agitação e transferido para a secadora à temperatura de 80°C por 1 h, para desidratar. Por fim, o gel foi exposto à membrana de Imaging Plate – IP (Fuji Photo Film CO.,Ltd; Bio Imaging Analyzer, Japan) por 1h. A atividade da histona (H1) e da MBP foram quantificadas por densitometria de bandas reveladas pelo software Image Gauge 3.1 (Fuji Film – Tóquio, Japão). As atividades de oócitos controle em VG (atividade basal a 0 h de cultivo) foram arbitrariamente determinadas com valor 1,0 e as atividades das demais amostras foram determinadas relativas a esse valor, de forma a ser determinado em quantas vezes a atividade das amostras eram maiores/menores que a atividade basal.

#### 5.6.2.1. Análise estatística

Como os valores de densitometria de bandas expressam contagem, em pixels, os dados foram transformados pela escala raiz quadrada do valor mais um (BANZATTO & KRONKA, 2006). Após a transformação, os dados foram submetidos à ANOVA considerando os efeitos de tratamento, idade ou tempo de maturação, intervalos de tempo durante o período de ativação, além das interações duplas e uma tripla entre estes fatores. O procedimento utilizado foi o PROC GLM do programa Statistical Analysis System, versão 9.1.13 (SAS, 1995). Em virtude de

interações significativas, entre as fontes de variação idade e tempo, utilizou-se o desdobramento, visando estudar o comportamento do tempo dentro de cada idade avaliada. O teste t de Student foi executado sempre que as fontes de variação: tempo dentro de cada tratamento foram significativas ( $p < 0,05$ ). Paralelamente, realizou-se análise de regressão, pelo PROC GLM, para avaliação do comportamento das proteínas MPF e MAPK segundo o efeito do tempo de ativação dentro de cada idade ou tempo de maturação.

### 5.6.3. Experimento 3. Desenvolvimento Embrionário

O cultivo *in vitro* de grupos de 20 oócitos ativados foi realizado conforme descrição anterior (item 5.5.) por nove dias. Durante esse período, as taxas de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de 8 células foram avaliadas nas primeiras 48 h pós-ativação (hpa). No sétimo dia de cultivo (D7), foi avaliada a taxa inicial de oócitos ativados que alcançaram o estágio de blastocisto (bl) e, aos nove dias, a taxa final de blastocistos (bl) e de blastocistos eclodidos (be). Neste experimento, foi adicionado um grupo no qual os oócitos foram maturados por 22 h e submetidos ao tratamento com ionomicina + 6DMAP por 6 h (ID6h), para que pudessem ser avaliados o efeito do tempo de incubação e o efeito do uso do 6DMAP sozinho e associado ao estrôncio.

#### 5.6.3.1. Análise estatística

As taxas de desenvolvimento embrionário foram transformadas pela escala arco seno raiz das percentagens. Após a transformação, os dados foram submetidos à ANOVA considerando os efeitos de tratamento, idade ou tempo de maturação e interação tratamento x idade. O procedimento utilizado foi o PROC GLM do programa Statistical Analysis System, versão 9.1.13 (SAS, 1995). Nos casos de fontes de variação significativas ( $p < 0,05$ ), foi utilizado o teste t de Student.

#### 5.6.4. Experimento 4 - Qualidade dos Embriões Produzidos

A qualidade dos embriões produzidos foi avaliada pela contagem do número total de células. Ao nono dia de cultivo embrionário, os blastocistos foram fixados em solução de paraformaldeído 3,7%, corados com bisbenzimidazina (Hoechst 33342) por 10min e preparados em lâminas para microscopia.

A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência (Axioplan 2 - ZEISS) com sistema de captura digital de imagens e filtro adequado para o corante. A contagem total de células foi realizada com o auxílio do programa Axio Vision Release 4.1, no qual foi possível marcar e contar os núcleos corados.

Neste experimento, como no anterior foi adicionado o grupo ionomicina + 6DMAP por um período de 6 h (ID6h), para que pudessem ser avaliados os efeitos do tempo de incubação do 6DMAP sozinho e associado ao estrôncio, refletidos no desenvolvimento embrionário e na qualidade dos embriões produzidos.

##### 5.6.4.1. Análise estatística

O número total de células foi submetido à ANOVA considerando um modelo hierárquico contendo, os efeitos de idade e idade dentro de cada tratamento. O procedimento utilizado foi o PROC GLM do programa Statistical Analysis System, versão 9.1.13 (SAS, 1995). Nos casos de fontes de variação significativas ( $p < 0,05$ ), foi utilizado o teste t de Student.

#### 5.6.5. Experimento 5 - Técnica de TUNEL

A técnica de TUNEL (do Inglês, *Terminal Deoxynucleotil Transferase Uracil Nick End Labeling*) foi utilizada para a identificação, *in situ*, da fragmentação internucleossômica do DNA, por meio do Kit *In Situ Cell Detection Kit Fluorescein* (Roche®, Germany) conforme a descrição a seguir:

Ao nono dia de cultivo *in vitro*, os embriões foram lavados em solução de 1 mg/mL de polivinil-pirrolidona (PVP) em PBS para a lavagem e fixados por 1 h em solução de 3,7% de paraformaldeído em PBS à temperatura ambiente. Posteriormente foram novamente lavados em PBS acrescido de PVP e

permeabilizados (0,5% de Triton X-100 e 0,1% de citrato de sódio em PBS) por 1 h em temperatura ambiente e foram lavados novamente. A seguir, os grupos foram divididos em subgrupos para os controles positivo e negativo e os grupos tratamentos para análise experimental. O grupo positivo foi incubado com 3U de DNase I (FPLC*pure*<sup>™</sup>, Amersham Biosciences # 27-0514) diluída em tampão (40 mM de Tris-HCl, 6 mM de MgCl<sub>2</sub>, em H<sub>2</sub>O) por 1 hora a 37°C. Após a lavagem, controle positivo e amostras foram incubados em solução de TUNEL contendo a enzima 90% de solução marcadora e 10% de solução enzimática por 1 h a 37°C no escuro. Durante o mesmo período de incubação, o controle negativo da reação foi formado com embriões incubados apenas com solução marcadora (livre de enzima). Por fim, foram lavados em PBS/PVP e corados com Hoechst 33342 (10 µg/mL) por 10min, transferidos para lâminas histológicas contendo uma gota de *Anti-fade* - Mounting Medium for Fluorescence (Vector Laboratories, Inc; Vectashield ®; Burlingame), substância preservadora de fluorescência. Foram analisados em microscopia de epifluorescência com filtros adequados para os dois corantes. O Hoechst foi analisado no filtro com comprimento de onda de excitação é 365 nm e de emissão 420 nm e o fluorocromo FITC com comprimento de onda de excitação de 450 nm e emissão de 515 nm. Os núcleos fluorescentes em azuis (corante Hoechst 33342) indicaram a presença e localização de todas as células com o DNA total e os núcleos fluorescentes em verde pelo corante isotiocianato de fluoresceína (FITC) indicaram apenas as células com fragmentação de DNA.

#### 5.6.5.1. Análise estatística

As taxas de células positivas pela técnica de TUNEL avaliadas foram transformadas pela escala arco seno raiz das percentagens de TUNEL positivas. Após as transformações os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) considerando os efeitos de tratamento, idade ou tempo de maturação e interação tratamento x idade. O procedimento utilizado foi o PROC GLM do programa Statistical Analysis System, versão 9.1.13 (SAS, 1995). Nos casos de fontes de variação significativas ( $p < 0,05$ ), foi utilizado o teste t de Student.

#### 5.6.6. Experimento 6 - Caspase-3 Ativa

Neste trabalho, a via de morte celular programada (MCP) pela caspase-3 ativa foi analisada por imunofluorescência indireta. Os embriões partenogênicos foram coletados ao nono dia de cultivo e fixados em 3,7% de paraformaldeído diluído em PBS. Posteriormente, foram lavados em PBS/PVP, permeabilizados (0,1% de Triton X-100 diluído em PBS com 0,1% de PVP) e lavados em PBS com 0,1% de PVP. Em seguida, os embriões foram pré-incubados com tampão de bloqueamento (2% BSA, 0,2% leite em pó desnatado, 2% de soro de cabra e 0,8% de Triton X-100 em PBS com 0,1% de PVP) à temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente, foram incubados com anticorpo policlonal (*Anti-Caspase – 3 Cleaved, Human-Rabbit*; Oncogene, US e Canadá) na diluição de 1:100 em PBS por 1h em câmara úmida à temperatura ambiente. Após o período de incubação, os embriões foram lavados em PBS/PVP e, então, incubados com o segundo anticorpo (*Anti-Rabbit IgG, Chain Specific, Rhodamine Conjugate*; Calbiochem, US e Canadá) diluído na proporção 1:100 em PBS durante 1 h em câmara úmida e temperatura ambiente. Após este período, os embriões foram lavados em PBS, corados com Hoechst e colocados em lâminas histológicas contendo uma gota de *Anti-fade*. A análise foi realizada em microscópio invertido confocal (True Confocal Scanner, Mod. LEICA TCS-SP2) no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Para o corante Hoechst foi utilizado filtro com 365 nm de excitação e 420 nm de emissão e para a Rodamina, filtro com 546 nm de excitação e 590 nm de emissão.

##### 5.6.5.1. Análise estatística

As percentagens de células caspase positivas foram transformadas pela escala arco seno raiz das percentagens. Após as transformações os dados foram submetidos à ANOVA considerando os efeitos de tratamento, idade ou tempo de maturação e interação tratamento x idade. O procedimento utilizado foi o PROC GLM do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.13 (SAS, 1995).

### 5.6.7. Experimento 7 - Expressão de Interferon-Tau (IFN- $\tau$ ) em Embriões Partenogênicos

Setenta e dois blastocistos eclodidos, coletados no nono dia de desenvolvimento, foram congelados em microtubos em *pool* de 6 embriões e submetidos à síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) utilizando o kit *ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase* (Promega, Madison, WI, EUA). Para tanto, os microtubos contendo os embriões foram incubados por 5 min a 70°C com 1  $\mu$ L de oligo dT (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L) e 1  $\mu$ L de água livre de RNase, e imediatamente resfriados a 4°C para a adição de 5  $\mu$ L de tampão de reação 5x, 1  $\mu$ L de enzima transcriptase reversa (Improm-II®, Promega, EUA), 1  $\mu$ L de dNTPs (10mM de cada), 1  $\mu$ L de RNase OUT (1U/ $\mu$ L – Invitrogen) em um volume final de 20  $\mu$ L. As amostras foram aquecidas a 42°C por 1 h, a 70°C por 15 min e utilizados em seguida na reação de PCR em tempo real. O restante do cDNA foi armazenado a -20°C.

A avaliação da expressão do gene interferon-tau (IFN- $\tau$ ) foi realizada em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System, EUA) com o sistema de coloração *TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Essa coloração segue o princípio FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) e emite sinal de fluorescência quando a sonda é degradada e o fluoróforo está em solução. O GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) foi utilizado como gene constitutivo para normalização dos dados. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e as sondas utilizados para mensurar a frequência dos transcritos do GAPDH e do bIFN- $\tau$  estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Seqüência dos *primers* e das sondas utilizados no experimento de expressão do gene IFN- $\tau$  em embriões partenogênicos bovinos no estágio de blastocisto eclodido

| Primers (F e R) e Sondas (S) |  |
|------------------------------|--|
| <b>GAPDH</b>                 | F: 5'--3' AAGGCCATCACCATCTTCCA                 |
|                              | R: 5'--3' CCACTACATACTCAGCACCAGCAT             |
|                              | S: 5'--3' VIC-AGCGAGATCCTGCCAACATCAAGTGG-TAMRA |
| <b>IFN-<math>\tau</math></b> | F: 5'--3' CCTTCGTGCTCTCTCTACTGATG              |
|                              | R: 5'--3' CAGGTAACAACCCAGAGATCGT               |
|                              | S: 5'--3' FAM-CCGTAGCTGACCAGCACC-NFQ           |

Na PCR em tempo real para os genes GAPDH e bIFN- $\tau$ , utilizou-se 0,25  $\mu$ M da sonda TaqMan<sup>®</sup>, 0,9  $\mu$ M de cada *prime* e 3  $\mu$ L de cDNA, correspondente a 0,9 de embrião, em reação de 20  $\mu$ L. Em todas as reações foi utilizado o corante ROX como referência passiva. A reação teve início com incubação a 50°C por 2 min, seguida de desnaturação a 95°C por 10 min e 55 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 45 segundos. Cada amostra foi avaliada em duplicata e todas as reações de PCR continham um controle livre de amostra (branco).

#### 5.6.7.1. Análise estatística

Para o cálculo da eficiência da reação foi utilizado o software “LinRegPCR” (RAMAKERS et al., 2003), no qual o cálculo da eficiência é baseado na curva de amplificação individual de cada tubo ( $\Delta R_n$ ). Foram estabelecidos os limites inferior e superior (janela de linearidade) em que as amostras estavam em fase logarítmica, com o mínimo de 4 pontos incluídos na regressão e com correlação de, no mínimo, 0,999 (Figura 12). O *threshold* foi determinado dentro do intervalo delimitado pelos limites superior e inferior da reta de amplificação utilizada para o cálculo da eficiência, garantindo assim que os *cycle threshold* (CTs) adquiridos encontravam-se dentro da reta de eficiência conhecida. Utilizando-se o *threshold* calculado para cada gene, determinou-se os valores dos CTs de cada amostra no programa *7500 System SDS Software*. A quantificação final da expressão relativa dos genes de interesse foi realizada utilizando-se a comparação dos CTs de acordo com a eficiência individual

de cada reação (SCHEFE et al., 2006). Os cálculos foram baseados na diferença dos CTs do gene alvo (IFN- $\tau$ ) normalizados pelos transcritos do gene controle endógeno GAPDH e calibrados com um indivíduo. Foram testadas duas normalizações, a primeira com o indivíduo que apresentou maior expressão por repetição e a segunda com o indivíduo de menor expressão. Os dados normalizados referentes à quantificação relativa do gene do IFN- $\tau$  foram submetidos à ANOVA utilizando o GLM do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.13 (SAS, 1995).



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Experimento 1 - Taxa de Ativação

No total dos tratamentos, aproximadamente 300 oócitos foram analisados quanto à taxa de ativação pela identificação e contagem de pronúcleos. Os oócitos desse experimento foram divididos em dois grandes grupos: não ativados e ativados independentemente do número de pronúcleos formados, e os resultados estão descritos na tabela 2 e na figura 3. O grupo controle, com 18 oócitos analisados, apresentou 77% (14/18) de oócitos em estágio de metáfase. Desse grupo, apenas 4 oócitos progrediram no ciclo celular e chegaram ao estágio de duas células.

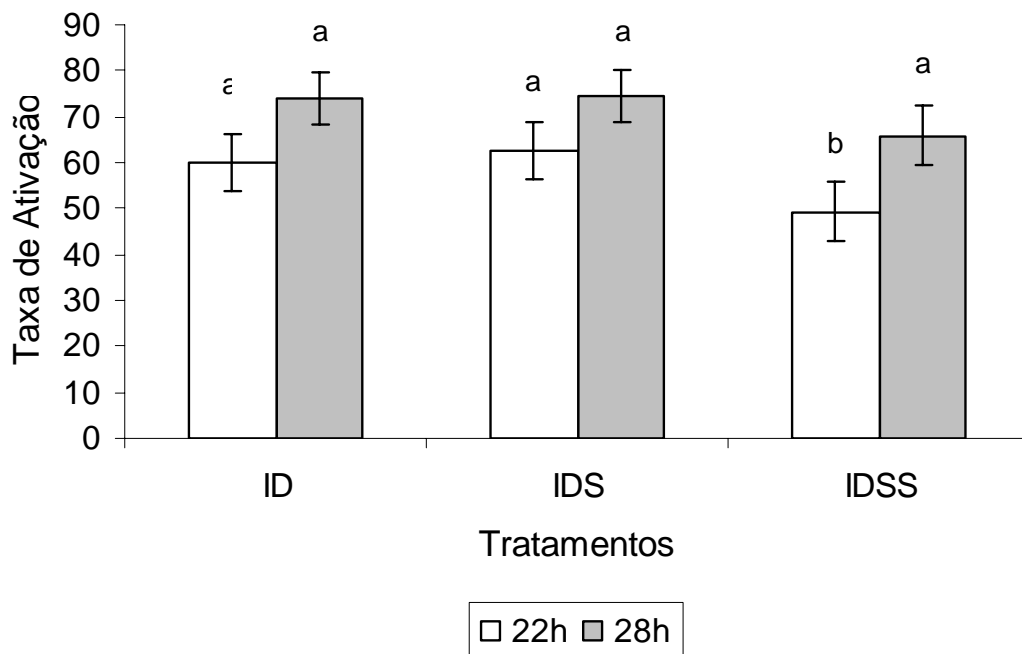
Quanto ao critério idade ou tempo de maturação *in vitro* dos oócitos bovinos submetidos aos tratamentos ativadores, os oócitos envelhecidos apresentaram taxas de ativação (média  $\pm$  erro padrão) melhores ( $71,403 \pm 3,36$ ;  $p=0,0078$ ) em relação aos oócitos jovens ( $57,279 \pm 3,68$ ). No grupo de oócitos jovens, os tratamentos ID ( $60,033 \pm 6,38$ ) e IDS ( $62,523 \pm 6,38$ ) foram superiores ( $p<0,05$ ) ao grupo IDSS ( $49,282 \pm 6,38$ ). No grupo de oócitos envelhecidos, não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos utilizados.

**Tabela 2.** Taxa de ativação (média  $\pm$  erro padrão) de oócitos bovinos jovens (22 h) e envelhecidos (28 h) após tratamentos ativadores.

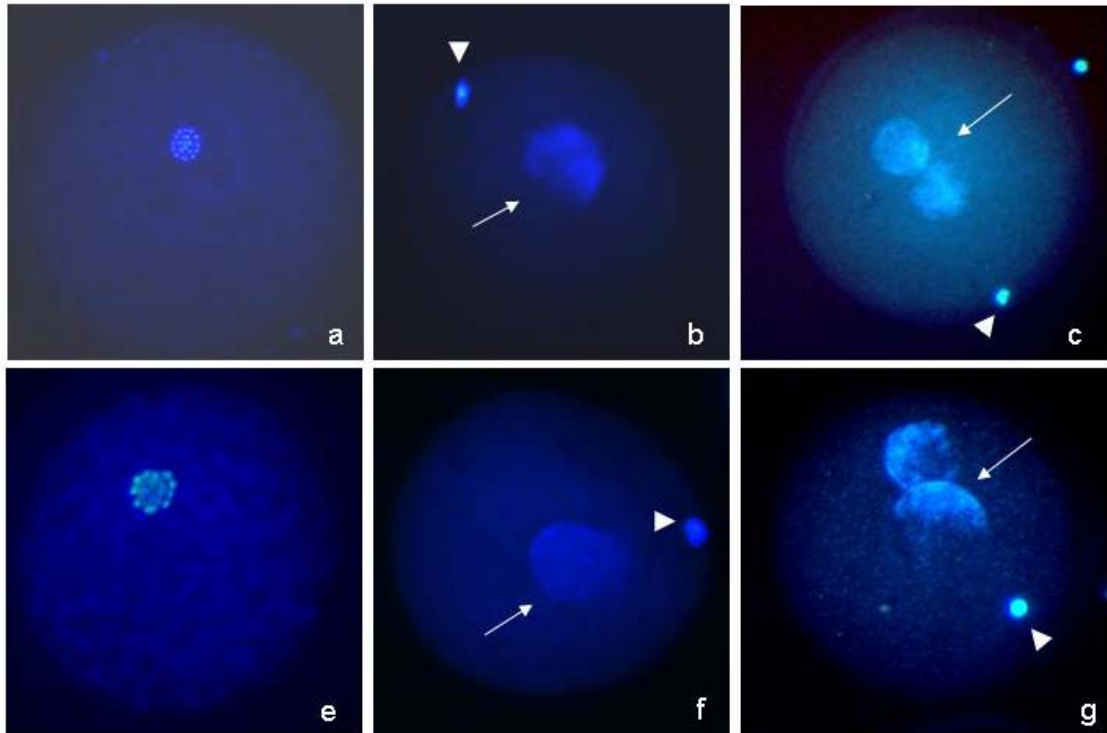
| Tempo de Maturação<br>(Idade) | N<br>(oócitos) | *Tratamentos | Taxa de Ativação<br>(média $\pm$ erro padrão) |
|-------------------------------|----------------|--------------|---|
| 22 h                          | 49             | <b>ID</b>    | $60,033 \pm 6,38^a$                           |
|                               | 49             | <b>IDS</b>   | $62,523 \pm 6,38^a$                           |
|                               | 49             | <b>IDSS</b>  | $49,282 \pm 6,38^b$                           |
| 28 h                          | 58             | <b>ID</b>    | $73,968 \pm 5,53^a$                           |
|                               | 57             | <b>IDS</b>   | $74,413 \pm 5,53^a$                           |
|                               | 53             | <b>IDSS</b>  | $65,829 \pm 6,38^a$                           |

<sup>a,b</sup> Letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os dados diferem entre si, com  $p<0,05$ . \*Tratamentos: ID – ionomicina (5  $\mu$ M por 5 min)+ 6DMAP (2mM por 3 h); IDS - ionomicina (5  $\mu$ M/ 5 min )+ (2mM de 6DMAP+20 mM de  $Sr^{2+}$ ) por 6 h e IDSS - ionomicina (5  $\mu$ M/5 min )+ (2mM de 6DMAP+20 mM de  $Sr^{2+}$ ) por 3 h + 20 mM de  $Sr^{2+}$  por 3 h. Os tratamentos foram os mesmos para ativar tanto oócitos jovens como envelhecidos.

A adição do estrôncio não afetou a taxa de ativação, mostrando que independente do tratamento, o primeiro estímulo ativador, comum a todos os tratamentos, com o ionóforo ionomicina já foi suficiente para ativar oócitos envelhecidos (Figura 4). Por outro lado, quando os mesmos tratamentos foram utilizados no grupo dos oócitos jovens, diferiram entre si. O tratamento ionomicina + associação [6-DMAP+Sr] por 3 h + Sr/3 h, apresentou taxa de ativação inferior aos demais tratamentos ( $49,282 \pm 6,38$ ) aplicados no grupo com a mesma idade e também no grupo dos envelhecidos, como demonstrado na tabela 2. O prolongamento do efeito ativador do estrôncio já utilizado na associação com 6DMAP interfere, diminuindo as taxas de ativação de oócitos jovens. O 6DMAP, associado ao estrôncio no tratamento ionomicina+ [6-DMAP+Sr] por 6 h não diferiu do tratamento ionomicina + 6DMAP (ID) onde o 6DMAP agiu por um tempo menor, pois ficou incubado por um período de 3 h sem combinação a outro agente ativador.



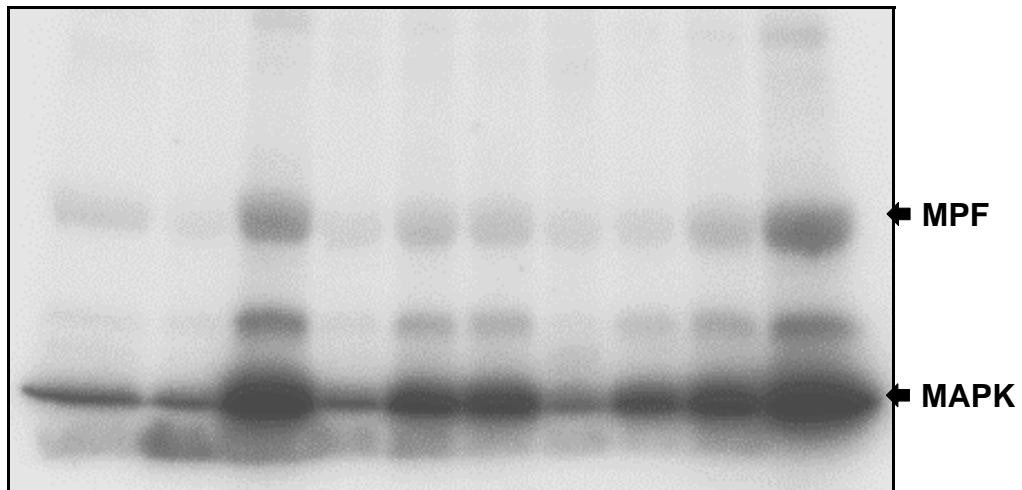
**Figura 3.** Representação gráfica da taxa de ativação partenogenética (médias  $\pm$  erro padrão) entre os tratamentos utilizados em oócitos jovens e envelhecidos. Oócitos envelhecidos apresentaram maior taxa de ativação em relação aos oócitos jovens ( $71,40 \pm 3,36$  e  $57,279 \pm 3,68$ , respectivamente) com  $p=0,0078$ . Entre os agentes químicos ativadores, apenas o tratamento ionomicina + associação [6-DMAP+Sr] + estrôncio ( $Sr^{2+}$ ) utilizado no grupo 22 h, diferiu apresentando a menor taxa ( $49,282 \pm 6,38$ ), sendo inferior aos demais ( $p<0,05$ ).



**Figura 4.** Fotomicrografia de oócitos bovinos maturados *in vitro* por 22 h (a-c) ou 28 h (e-g), ativados partenogeneticamente com diferentes agentes químicos e corados com bisbenzimidazina (Hoechst) e analisados 12 h após a ativação. Visualização em estereomicroscópio de epifluorescência, filtro com comprimento de onda de excitação igual a 365 nm e emissão de 420 nm. **a.** Oócito no estágio de metáfase II (MII) representante do grupo tratado com ionomicina + 6DMAP (ID22), mas que não respondeu ao tratamento de ativação. **b.** Zigoto com um pronúcleo obtido pelo tratamento ionomicina + [6DMAP+estrôncio] (IDS22). **c.** Zigoto com dois pronúcleos obtido após tratamento com ionomicina + [6DMAP+estrôncio] + estrôncio (IDSS22). **e.** Oócito em MII representante do grupo ativado com ionomicina + 6DMAP (ID28), mas que não respondeu ao tratamento. **f.** Zigoto com um pronúcleo obtido pelo tratamento ionomicina + [6DMAP+estrôncio] (IDS28). **g.** Zigoto com dois pronúcleos obtido após tratamento com ionomicina + [6DMAP+estrôncio] + estrôncio (IDSS28). As setas sinalizam o pronúcleo (PN) e as cabeças de setas sinalizam o corpúsculo polar (CP). Os oócitos foram considerados ativados ou não ativados, independente da quantidade de pronúcleos formados.

## 6. 2. Experimento 2 - Fator Promotor de Maturação (MPF) e Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK)

A atividade da histona (H1) e MBP foram quantificadas pela densitometria de bandas reveladas através do programa Image Gauge (FUJI FILM - Tóquio/Japão), como demonstrada na Figura 5.



**Figura 5.** Representação em gel de poliacrilamida a 15%, do ensaio da histona H1, com peso molecular aproximado de 35 KDa, marcando a atividade de MPF e da proteína MBP com peso molecular aproximado de 20,4 KDa, para MAPK.

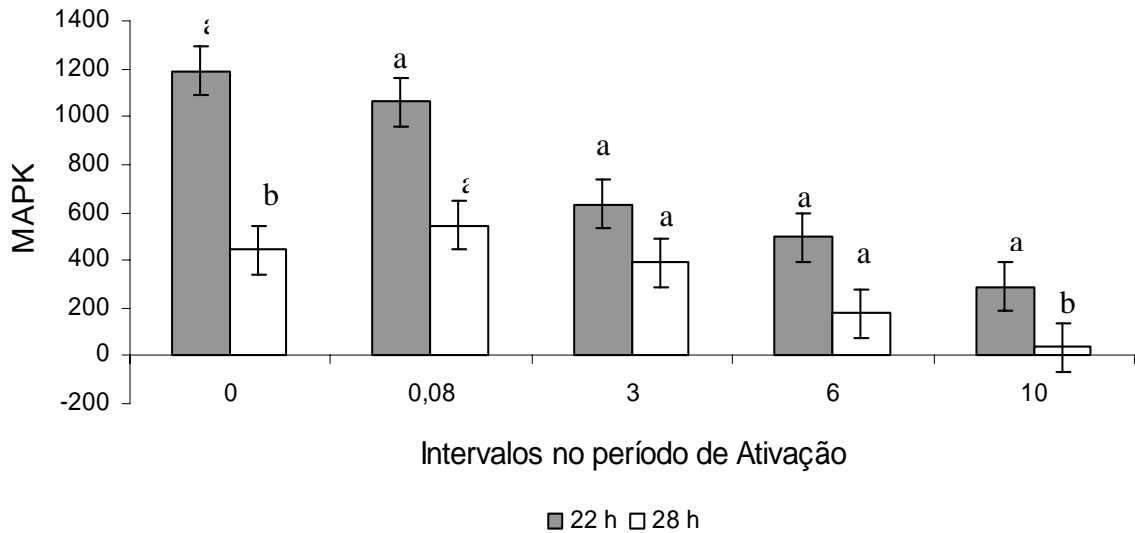
A atividade da MAPK foi analisada através do seu substrato, a proteína básica de mielina (MBP) e o MPF através da histona H1. O ensaio duplo foi executado com três repetições, cada amostra continha pool de 4 oócitos e foram divididas em três estádios: imaturo, maturados e ativados. Os intervalos entre o período de ativação foram marcados da seguinte forma 0 h início da ativação, 0,08 h corresponde ao tempo de 5 min, momento em que todos os oócitos tiveram seu primeiro estímulo químico para liberação de cálcio, com a ionomicina. O próximo intervalo foi às 3 h pós-ativação com a ionomicina, período marcado pela ação do 6DMAP no grupo ID e da associação [6DMAP+Sr] nestas três primeiras horas de ativação do outro IDSS. Após três horas novamente, outras amostras foram retiradas da placa de ativação, fechando 6 h da incubação da combinação [6DMAP+Sr] utilizada no tratamento IDS/6h e no tratamento IDSS. Apartir deste momento as amostras continuaram

sendo retiradas nas próximas 3 h, para marcar o tempo de ação dos agentes utilizados ao mesmo tempo em que coincidiu com o horário de manipulação pela troca de meio de ativação para meio de cultivo. O comportamento das duas cinases MAPK e MPF (Figuras 6 e 7) em oócitos bovinos ativados partenogeneticamente diferiu com relação ao tempo de maturação ou idade dos oócitos (Tabela 3 e 4) ao longo do período de ativação, mas não quanto ao tratamento utilizado na ativação. O intervalo denominado 0,08 h corresponde ao tempo de 5 min do ionóforo, uma vez visto que todos os intervalos estudados foram padronizados em horas.

**Tabela 3.** Atividade média em densidade integrada (unidades arbitrárias) da MAPK ao longo do período de ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens e envelhecidos

| <b>Tempo de Maturação</b><br>(Idade/h) | 0 h                 | 0,08 h              | 3 h                 | 6 h                 | 10 h                |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>22 h</b>                            | 34,509 <sup>a</sup> | 32,593 <sup>a</sup> | 25,180 <sup>a</sup> | 22,259 <sup>a</sup> | 16,975 <sup>a</sup> |
| <b>28 h</b>                            | 21,085 <sup>b</sup> | 23,334 <sup>a</sup> | 19,769 <sup>a</sup> | 13,419 <sup>a</sup> | 6,147 <sup>b</sup>  |

a,b Letras diferentes subscritas em uma mesma coluna indicam que os dados diferem entre si. Erro padrão (EP) igual a 3,362 para todos os dados.

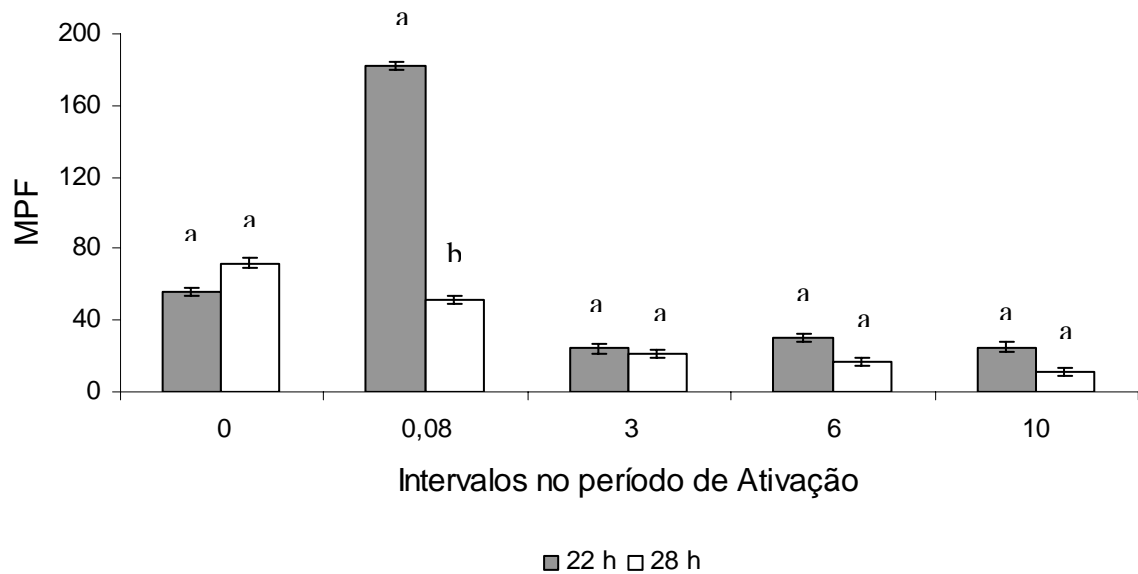


**Figura 6.** Representação gráfica do comportamento da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) ao longo do período de ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens e envelhecidos.

**Tabela 4.** Atividade média em densidade integrada (unidades arbitrárias) do Fator Promotor de Maturação ao longo do período de ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens e envelhecidos.

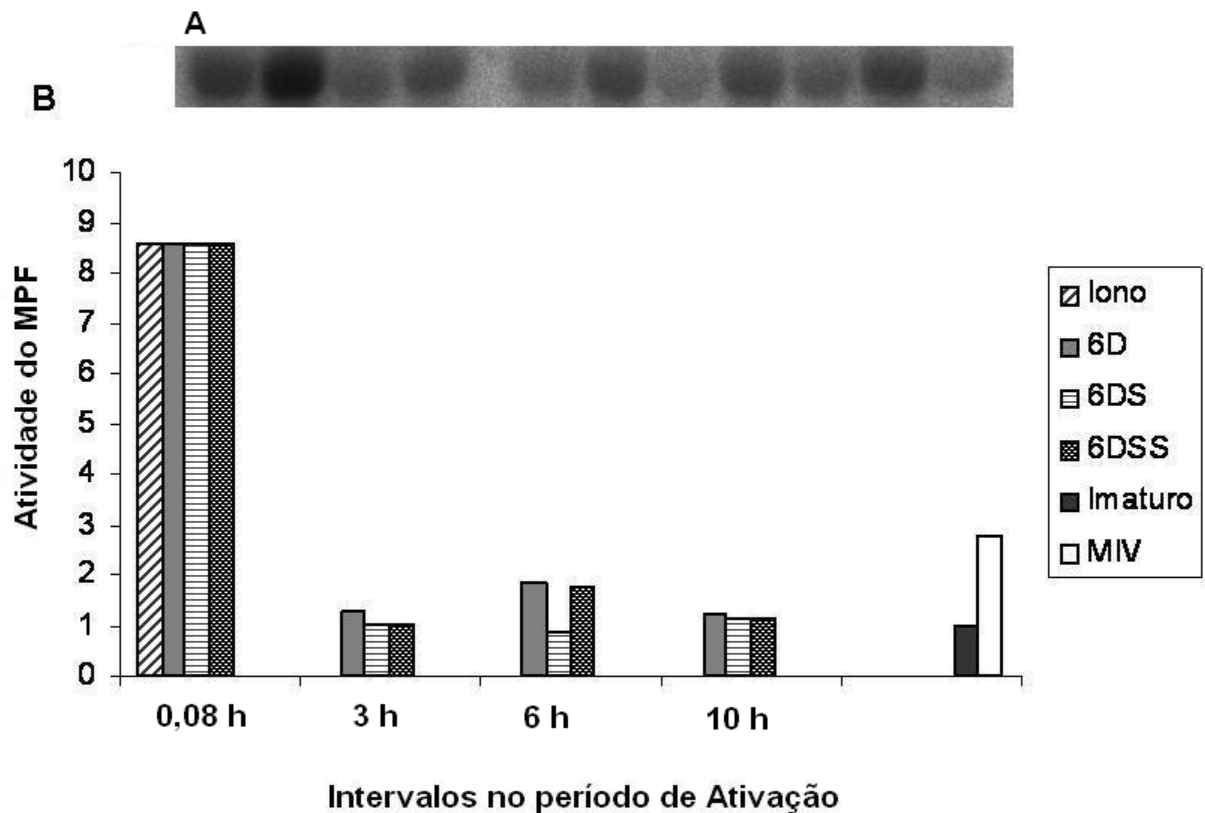
| Tempo de Maturação (Idade/h) | 0 h                | 0,08 h              | 3 h                | 6 h                | 10 h               |
|------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 22 h                         | 7,514 <sup>a</sup> | 13,529 <sup>a</sup> | 5,003 <sup>a</sup> | 5,544 <sup>a</sup> | 5,111 <sup>a</sup> |
| 28 h                         | 8,544 <sup>a</sup> | 7,256 <sup>b</sup>  | 4,676 <sup>a</sup> | 4,201 <sup>a</sup> | 3,541 <sup>a</sup> |

a,b Letras diferentes subscritas em uma mesma coluna indicam que os dados diferem entre si ( $p < 0,05$ ).



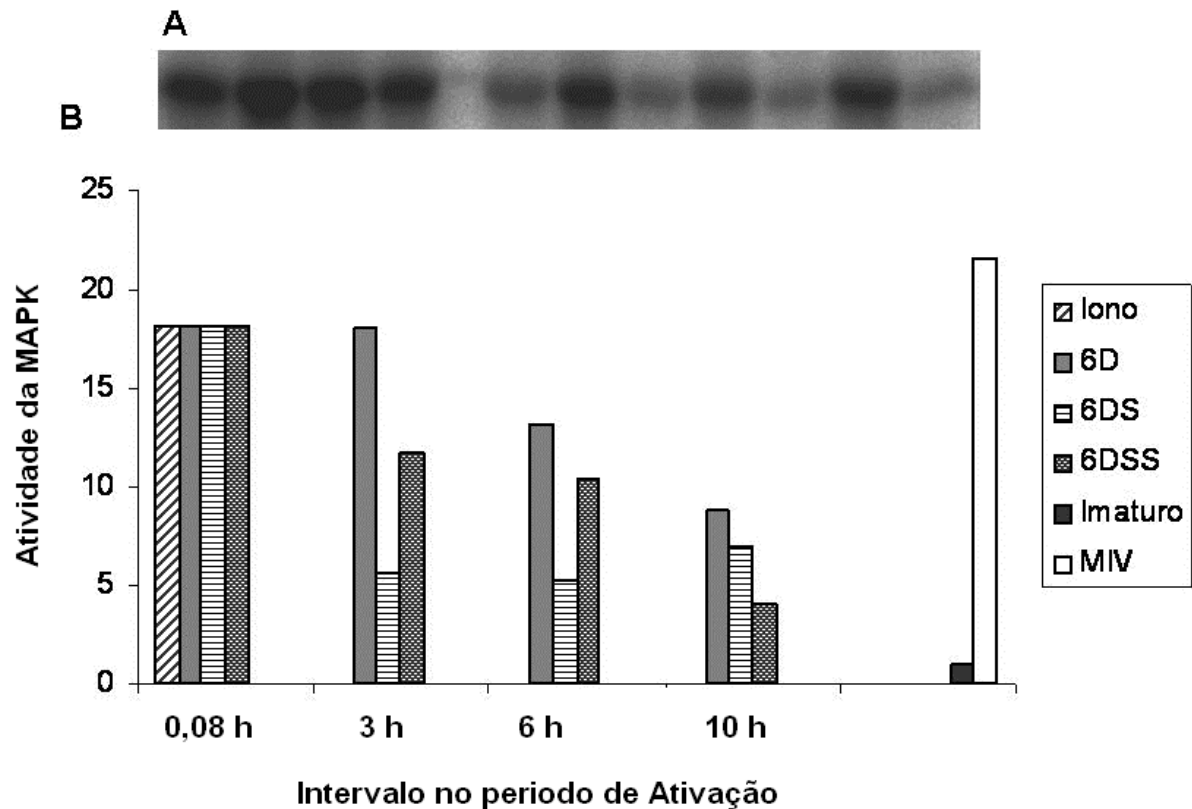
**Figura 7.** Representação gráfica do comportamento do Fator Promotor de Maturação (MPF) ao longo do período de ativação partenogênética de oócitos bovinos jovens e envelhecidos.

A atividade da MAPK é perdida de maneira gradual, tanto para decair como para restabelecer. Enquanto que a atividade do MPF é mais abrupta, decresce mais e com velocidade maior. Como os tratamentos não diferiram entre si, fica claro a partir dos resultados acima que houve uma diminuição da atividade tanto da MAPK quanto do MPF, efetiva para ativar os oócitos. Após 12 h de ativação foi observada a taxa de ativação pela formação de pronúcleos, processo incompatível com alta atividade das cinases. Houve diferença entre o tempo de maturação ou idade desses oócitos. Oócitos jovens apresentaram maior atividade de MPF e MAPK, por possuírem um estoque maior de reservas em comparação aos envelhecidos.



**Figura 8.** Atividade do MPF representada em cada tratamento utilizado para ativar oócitos bovinos jovens. **A.** Representação em gel, onde a análise foi realizada por densitometria de bandas, cada amostra continha um pool de 4 oócitos. **B.** Representação gráfica ao longo dos intervalos em horas durante o período de ativação partenogenética. Os tratamentos não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ) durante as 10 h primeiras horas analisadas. A diferença gráfica não é representativa de restabelecimento na atividade do MPF uma vez que se houve formação de pronúcleo as 12 h pós-ativação como foi comprovado no experimento 1. Como se trata de um pool, um oócito que não tenha respondido ao processo de ativação de maneira eficiente pode ter sido responsável por aumento aparente na atividade, mas que não interferiu em taxas de desenvolvimento embrionário com nível de significância de 5%.





**Figura 9.** Atividade da MAPK representada em cada tratamento utilizado para ativar oócitos bovinos jovens. **A.** Representação em gel, onde a análise foi realizada por densitometria de bandas, cada amostra continha um pool de 4 oócitos. **B.** Representação gráfica ao longo dos intervalos em horas durante o período de ativação partenogenética. Os tratamentos não diferiram entre si ( $p < 0,05$ ) durante as 10 h primeiras horas analisadas. A diferença gráfica não é representativa de restabelecimento na atividade do MPF uma vez que se houve formação de pronúcleos as 12 hpa como foi comprovado no experimento 1. Como se trata de pool, existe a possibilidade de um oócito que não tenha respondido ao processo de ativação de maneira eficiente, ser responsável pelo aumento aparente na atividade nos períodos entre 3 h e 6 h, mas que não interferiu em taxas de desenvolvimento embrionário com nível de significância de 5%.

### 6.3. Experimento 3 - Desenvolvimento Embrionário

Aproximadamente 4.200 oócitos bovinos foram submetidos ao processo de ativação partenogénica para a avaliação do desenvolvimento embrionário. A maturação *in vitro* foi dividida em dois períodos para ficar caracterizado o envelhecimento com 28 h, como supramencionado. A associação 6-dimetilaminopurina mais estrôncio (IDS) beneficiou a ativação e desenvolvimento de oócitos bovinos “jovens” mas a possibilidade de ser utilizada em oócitos jovens não implicou em diferenças no desenvolvimento embrionário ( $32,490 \pm 1,75$ ), com relação aos envelhecidos como constava nossa hipótese. Entretanto a associação utilizada no tratamento ionomicina+ [6DMAP+Sr] por 3 h mais  $Sr^{2+}$  por 3 h (IDSS22), ou seja, a adição de estrôncio por mais três horas, para ativar oócitos bovinos com 22 h de maturação, mostra uma tendência a prejudicar o desenvolvimento ao estágio de blastocisto ( $24,346 \pm 1,79$ ). Este comportamento não foi observado quando este mesmo tratamento foi utilizado em oócito envelhecidos, onde apresentou uma taxa de  $28,821 \pm 2,101$  não diferindo dos demais tratamentos com melhores taxas representadas na figura 10 . Não houve diferença entre os tratamentos quanto aos parâmetros de clivagem e 8 células, mas quanto a produção de blastocistos, houve diferença entre os tratamentos e entre os períodos de maturação (Tabela 5). Oócitos jovens ativados partenogeneticamente produzem um número menor de blastocistos que oócitos envelhecidos ( $p=0,004$ ). Entretanto, os grupos tratados com ionomicina + 6DMAP (ID) sozinho ou associado ao  $Sr^{2+}$  (IDS) incubado por um período de 6 h, não diferiram dos demais tratamentos com oócitos envelhecidos. Quando comparamos o tratamento IDMAP pelo período de incubação de 3 h ou 6 h, os melhores resultados em taxa de clivagem, 8 células e blastocistos foram obtidos com 6 h de incubação, superando as taxas obtidas no grupo dos envelhecidos. No entanto estes embriões produzidos apresentam um menor número de células. A associação [6DMAP+Sr] 6 h, não mostrou vantagens do uso destes agentes químicos combinados, em comparação ao uso do 6DMAP sozinho e pelo mesmo tempo de 6 h. A ativação partenogénica em oócitos bovinos envelhecidos não mostrou variação entre os tratamentos indicando que a ação do 6DMAP por 3 h já é suficiente para ativá-los.

**Tabela 5.** Desenvolvimento embrionário de oócito bovinos jovens e envelhecidos ativados com diferentes tratamentos

| <b>Tempo de maturação (Idade)</b> | <b>Tratamento</b> | <b>Clivagem</b><br>(media ± erro padrão) | <b>8 células</b><br>(media ± erro padrão) | <b>Blastocisto</b><br>(media ± erro padrão) | <b>Taxa de Eclosão</b><br>(media ± erro padrão) |
|-----------------------------------|-------------------|--|---|---|---|
| 22 h                              | <b>ID</b>         | 51,46 ± 2,41 <sup>b</sup>                | 27,23 ± 2,72 <sup>a</sup>                 | 21,43 ± 2,48 <sup>b</sup>                   | 37,29 ± 4,60 <sup>a</sup>                       |
|                                   | <b>IDS</b>        | 72,06 ± 2,44 <sup>a</sup>                | 26,54 ± 2,76 <sup>a</sup>                 | 30,44 ± 2,48 <sup>a</sup>                   | 34,28 ± 4,68 <sup>a</sup>                       |
|                                   | <b>IDSS</b>       | 51,21 ± 2,49 <sup>b</sup>                | 20,23 ± 2,81 <sup>a</sup>                 | 18,44 ± 2,52 <sup>a</sup>                   | 32,58 ± 4,76 <sup>a</sup>                       |
|                                   | <b>ID6h</b>       | 83,19 ± 7,73 <sup>a</sup>                | 26,98 ± 8,74 <sup>a</sup>                 | 37,64 ± 7,85 <sup>a</sup>                   | 47,78 ± 14,80 <sup>a</sup>                      |
| 28 h                              | <b>ID</b>         | 70,00 ± 2,99 <sup>a</sup>                | 24,10 ± 3,38 <sup>a</sup>                 | 28,29 ± 3,04 <sup>a, b</sup>                | 36,88 ± 5,73 <sup>a</sup>                       |
|                                   | <b>IDS</b>        | 73,20 ± 2,99 <sup>a</sup>                | 19,80 ± 3,38 <sup>a</sup>                 | 29,77 ± 3,04 <sup>a</sup>                   | 36,02 ± 5,73 <sup>a</sup>                       |
|                                   | <b>IDSS</b>       | 65,62 ± 2,92 <sup>a</sup>                | 22,37 ± 3,30 <sup>a</sup>                 | 24,30 ± 2,97 <sup>a</sup>                   | 38,34 ± 5,59 <sup>a</sup>                       |

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes sobrescritas em uma mesma coluna, indicam que os dados diferem entre si ( $p < 0,05$ ). \*Tratamentos: ID – ionomicina (5  $\mu\text{M}/5$  min)+ 6DMAP (2mM/ 3 h; IDS - ionomicina (5  $\mu\text{M}/5$  min) + (2mM de 6DMAP+20 mM de  $\text{Sr}^{2+}$ ) por 6 h e IDSS - ionomicina (5  $\mu\text{M}/5$  min) + (2mM de 6DMAP+20 mM de  $\text{Sr}^{2+}$ ) por 3 h + 20 mM de  $\text{Sr}^{2+}$  por 3 h. Somente oócitos jovens foram submetidos ao tratamento: ID6h – ionomicina (5  $\mu\text{M}/5$  min)+ 6DMAP (2mM/ 6 h), os demais tratamentos foram utilizados para ativar tanto oócitos jovens como envelhecidos

#### 6.4. Experimento 4 - Qualidade dos Embriões Produzidos

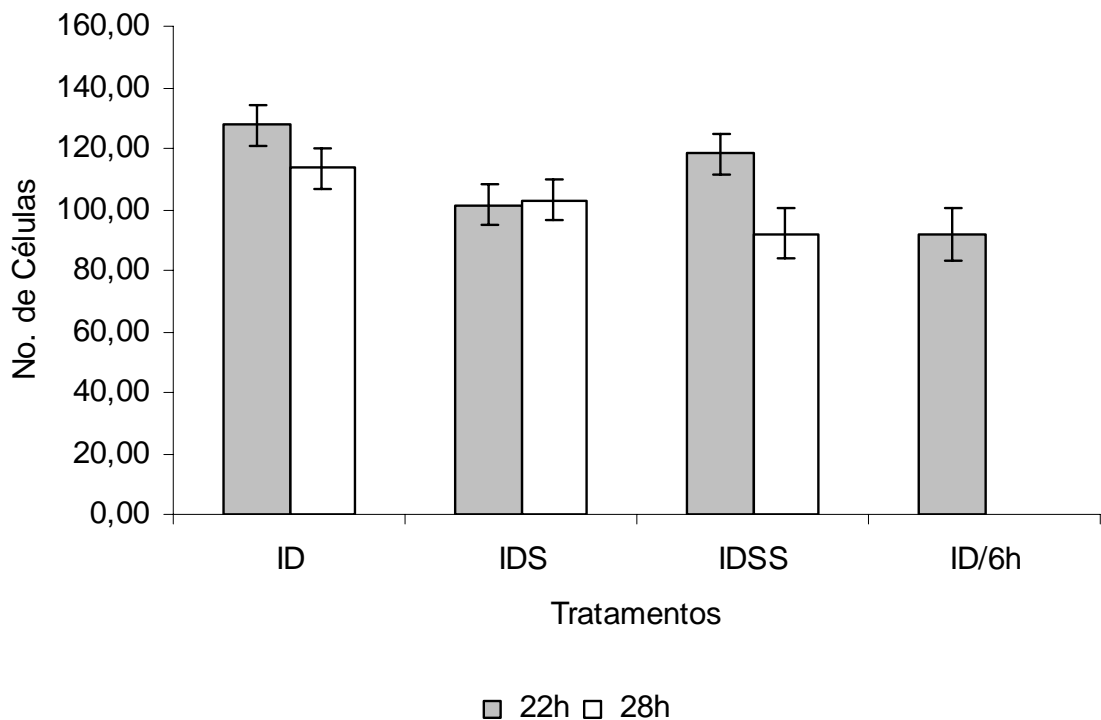
Foram avaliados 310 embriões neste experimento as duas variáveis analisadas, tratamento e idade (tempo de maturação), diferiram quanto à qualidade dos embriões produzidos (Tabela 6). O tratamento ionomicina + associação [6DMAP+Sr] por 3 h + Sr/3h quando utilizado na ativação de oócitos envelhecidos, produz blastocistos com número menor de células.

**Tabela 6.** Comparativo entre as idades ou tempo de maturação *in vitro* e o efeito de cada tratamento refletido na qualidade dos embriões produzidos, pelo número total de células

| *Tratamentos | Tempo de Maturação<br>(Idade)         |                                       |
|--------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
|              | 22 h                                  | 28 h                                  |
| <b>ID</b>    | 127,48 ± 6,60 <sup>a,A</sup> (n=50)   | 113,56 ± 6,60 <sup>a,A</sup> (n=50)   |
| <b>IDS</b>   | 101,42 ± 6,60 <sup>b,c,A</sup> (n=50) | 102,94 ± 6,60 <sup>a,b,A</sup> (n=50) |
| <b>IDSS</b>  | 118,34 ± 6,60 <sup>a,b,A</sup> (n=50) | 92,07 ± 8,52 <sup>b,c,B</sup> (n=30)  |
| <b>ID6h</b>  | 91,73 ± 8,52 <sup>c</sup> (n=30)      |                                       |

<sup>a,b,c</sup>Letras diferentes sobrescritas em uma mesma coluna indicam que os dados diferem entre si ( $p < 0,05$ ). <sup>A,B</sup>Letras diferentes sobrescritas em uma mesma linha indicam que os dados diferem entre si ( $p < 0,05$ ). \*Tratamentos: ID – ionomicina (5  $\mu$ M/5 min)+ 6DMAP (2mM/ 3 h; IDS - ionomicina (5  $\mu$ M/ 5 min )+ (2mM de 6DMAP+20 mM de  $Sr^{2+}$ ) por 6 h e IDSS - ionomicina (5  $\mu$ M/5 min )+ (2mM de 6DMAP+20 mM de  $Sr^{2+}$ ) por 3 h + 20 mM de  $Sr^{2+}$  por 3 h. Somente oócitos jovens foram submetidos ao tratamento: ID6h – ionomicina (5  $\mu$ M/5 min)+ 6DMAP (2mM/ 6 h), os demais tratamentos foram utilizados para ativar tanto oócitos jovens como envelhecidos

Em oócitos jovens a redução no número total de células ocorreu com a utilização do tratamento ionomicina + 6DMAP incubado por um período de 6 h, diferindo dos demais (figura 10). Quando focalizamos a análise para o efeito idade em cada tratamento, observou-se um efeito deletério do  $Sr^{2+}$  possivelmente relacionado a ativação, nos oócitos envelhecidos no grupo em que o  $Sr^{2+}$  age sem a presença do 6DMAP por um período de 3 h.



**Figura 10.** Relação entre os tratamentos ativadores utilizados em oócitos bovinos jovens e envelhecidos e a qualidade estimada pelo número de células, dos embriões produzidos. Os grupos ionomicina + 6DMAP (ID/6h) por 6 h usado na ativação de oócitos jovens e ionomicina + [6DMAP+Sr] nas primeiras três horas + Sr por mais 3 h (IDSS) usado na ativação de oócitos envelhecidos apresentaram médias de número total de células inferiores quando comparados aos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

## 6.5. Experimento 5 - Técnica de TUNEL

Cento e quatorze embriões no estágio de blastocistos, ao nono dia de cultivo foram avaliados quanto a ocorrência de fragmentação nuclear pela técnica de Tunel. Neste experimento, foi diminuído o número de tratamentos testados pela limitação da quantidade de oócitos necessária e pelos resultados dos experimentos anteriores, ficando claro o prejuízo do uso do  $Sr^{2+}$  na combinação testada no tratamento Ionomicina + [6DMAP+Sr] por 3 h +  $Sr^{2+}$  por mais 3 h. A partir deste experimento, os demais foram realizados com os quatro tratamentos, agora definidos: Ionomicina + 6DMAP por 3 h (ID) em oócitos jovens (ID22) e em envelhecidos (ID28) e o outro tratamento ionomicina + [6DMAP+Sr] por 6 h, também utilizado em oócitos jovens (IDS22) e em envelhecidos (IDS28).

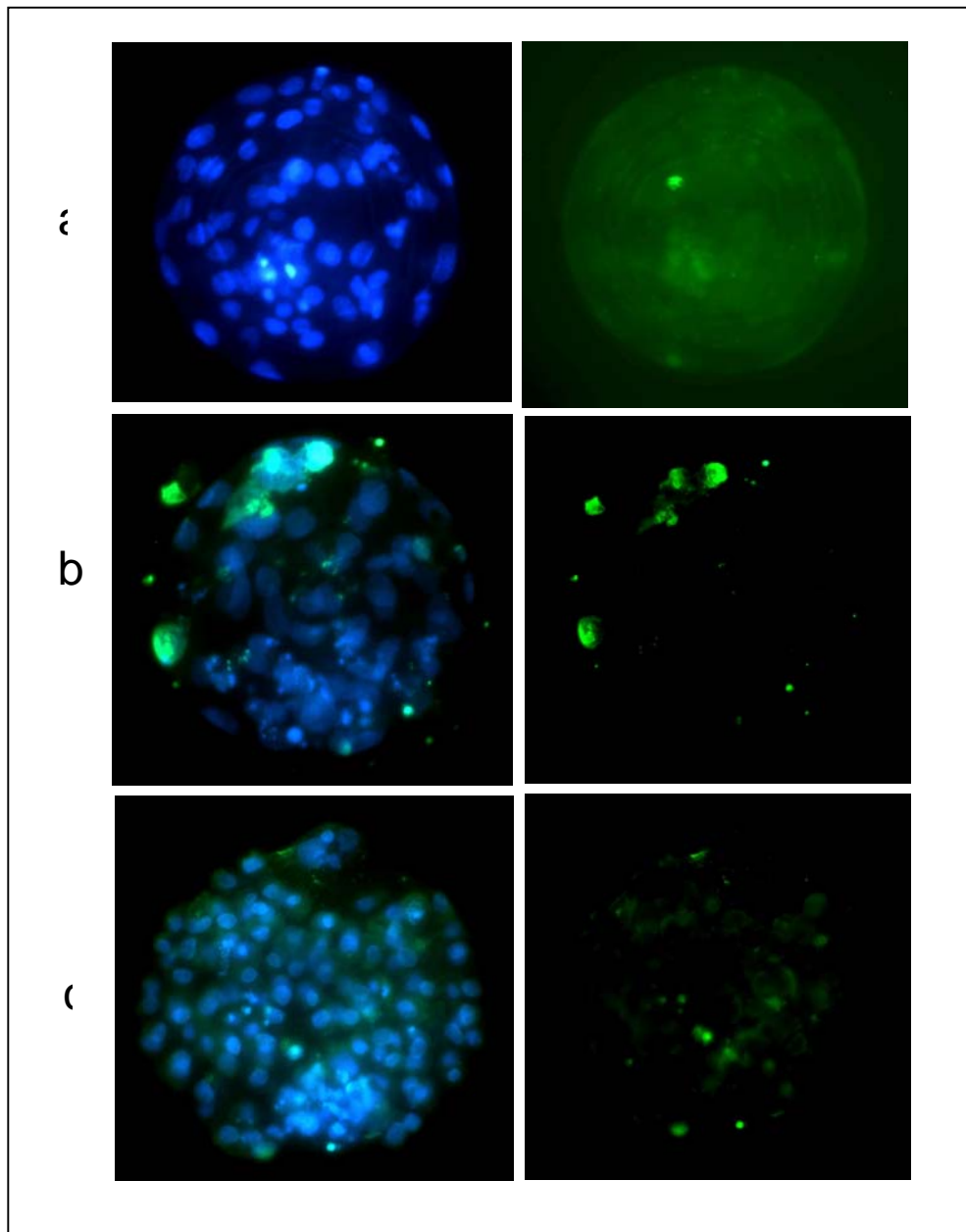
Não foi constatada diferença entre os tratamentos utilizados quanto à incidência ou taxa de fragmentação nuclear (média  $\pm$  erro) em embriões partenogenéticos oriundos de oócitos jovens. A adição do estrôncio ao 6-DMAP, no grupo IDS não alterou a taxa de células fragmentadas quando este foi utilizado para ativar oócitos jovens. Ao passo que, o mesmo tratamento quando usado em oócitos envelhecidos produziu embriões com menor taxa de fragmentação nuclear ( $9,10 \pm 1,566$ ), diferindo dos demais grupos (Tabela 7). Foi observada significância entre os dados quanto ao critério Idade ou período de maturação dos oócitos. Contrariamente ao que se esperava, embriões partenogénéticos oriundos de oócitos jovens apresentam maior taxa de fragmentação nuclear que embriões partenogénéticos oriundos de oócitos envelhecidos.

**Tabela 7.** Fragmentação nuclear estimada pela técnica de TUNEL em embriões partenogenéticos bovinos analisados no 9º dia de cultivo

| <b>*Tratamentos</b> | <b>Idade</b> | <b>N</b><br>(embriões) | <b>Nº Total de Célis</b><br>(média ± erro padrão) | <b>Taxa de Tunel</b><br>(média ± erro) |
|---------------------|--------------|------------------------|---|--|
| <b>ID</b>           | 22 h         | 24                     | 130,291 ± 11,86                                   | 14,512 ± 1,751 <sup>a</sup>            |
| <b>IDS</b>          | 22 h         | 30                     | 97,766 ± 7,27                                     | 14,179 ± 1,566 <sup>a</sup>            |
| <b>ID</b>           | 28 h         | 30                     | 121,766 ± 9,453                                   | 13,07 ± 1,566 <sup>a</sup>             |
| <b>IDS</b>          | 28 h         | 30                     | 105,133 ± 7,201                                   | 9,10 ± 1,566 <sup>b</sup>              |

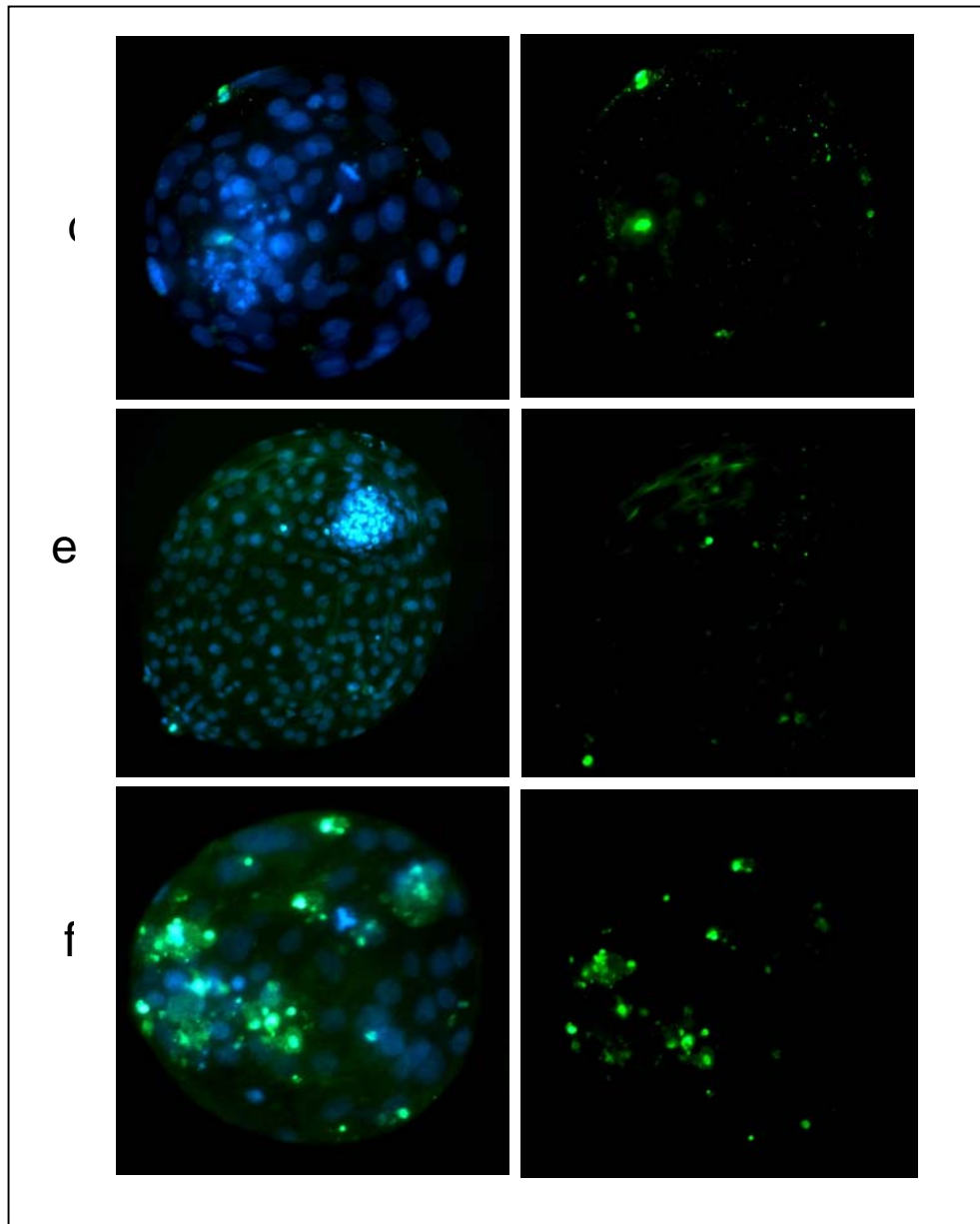
a,b Letras diferentes subscritas na mesma coluna indicam que os dados diferem entre si ( $p < 0,05$ ). \*Tratamentos: ID – ionomicina (5  $\mu$ M / 5 min)+ 6DMAP (2mM/ 3 h); IDS - ionomicina (5  $\mu$ M/ 5 min) + (2 mM de 6DMAP+20 mM de  $Sr^{2+}$ ) por 6 h. Os tratamentos foram os mesmos para ativar tanto oócitos jovens como envelhecidos.

Não houve diferença entre os tratamentos utilizados quanto à incidência ou taxa de fragmentação nuclear em embriões partenogenéticos ao nono dia de cultivo embrionário. Observou-se significância quanto ao critério Idade ou tempo de maturação dos oócitos. Embriões partenogenéticos oriundos de oócitos bovinos maturados *in vitro* por um período de 22 h e ativados partenogeneticamente com ionomicina e 6-dimetilaminopurina associado ou não com estrôncio apresentam uma incidência maior de fragmentação nuclear avaliada neste estudo, pela técnica de Tunel (Figura 5). O mesmo não ocorreu com embriões oriundos de oócitos envelhecidos, ou seja maturados *in vitro* por um período de 28 h, onde se observou uma taxa de fragmentação nuclear menor.



**Figura 11.** Fotomicrografia de epifluorescência de embriões partenogenéticos ao nono dia de cultivo, produtos da ativação partenogenética de oócitos bovinos maturados *in vitro* por 22 h (jovens) e/ou 28 h (envelhecidos) submetidos a tratamentos ativadores diferentes. Coluna da esquerda: coloração com Hoechst 33342, coluna da direita coloração com Isotiocianato de fluoresceína – FITC. a. Controle negativo. b. Controle positivo. c. Tratamento Ionomicina + 6DMAP – (ID22) utilizado na ativação de oócitos jovens.





**Figura 12.** Fotomicrografia de epifluorescência de embriões partenogenéticos ao nono dia de cultivo, produtos da ativação partenogenética de oócitos bovinos maturados por 22 h (jovens) e 28 h (envelhecidos) submetidos a tratamentos ativadores diferentes. Coluna da esquerda: coloração com Hoechst, coluna da direita coloração verde com Isotiocianato de fluoresceína (FITC). d. Tratamento Ionomicina + (6DMAP+Sr) utilizado em oócitos jovens (IDS22). e. Tratamento Ionomicina + 6DMAP utilizado em oócitos envelhecidos (ID28). f. Tratamento Ionomicina + (6DMAP+Sr) utilizado em oócitos envelhecidos (IDS28).

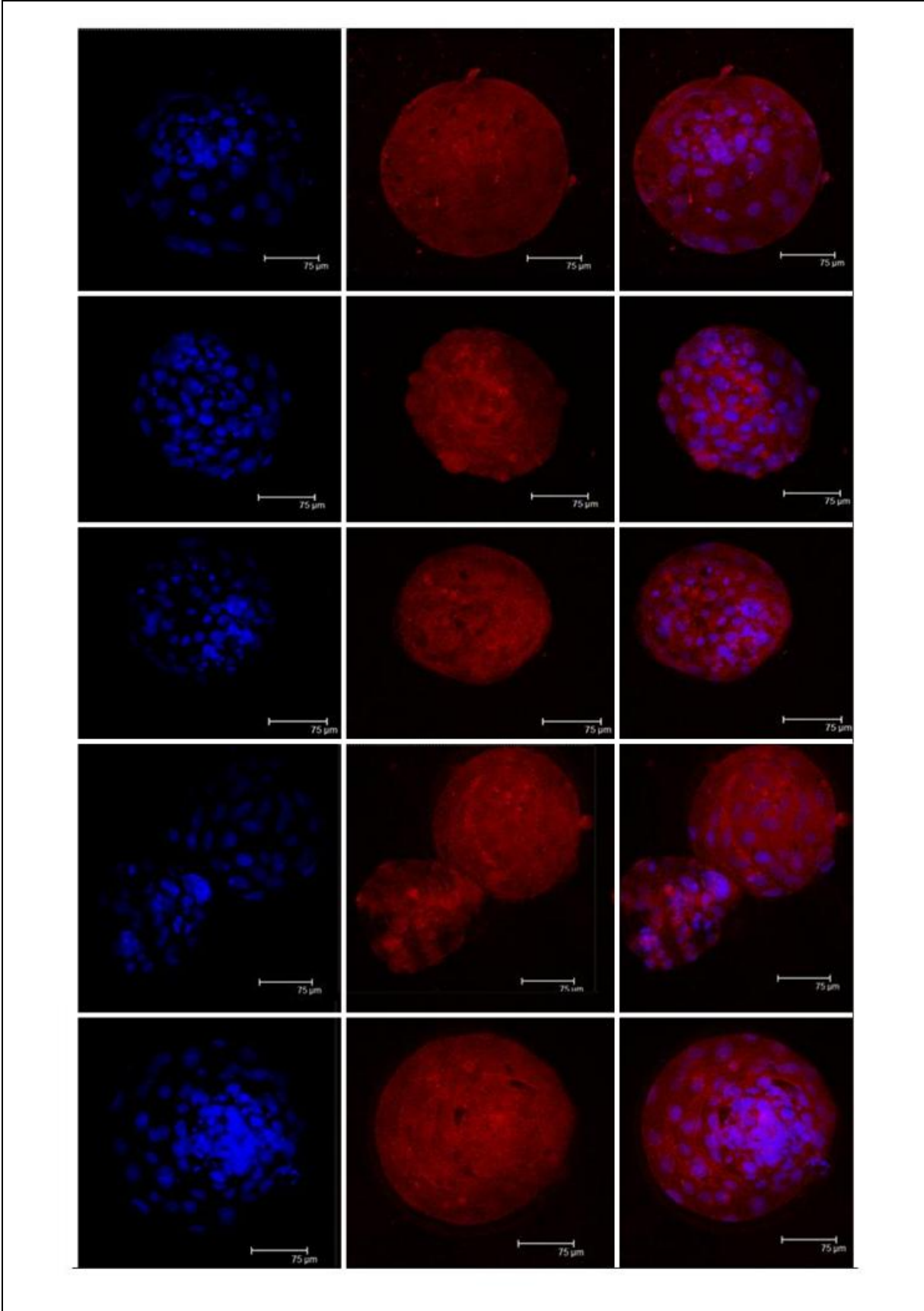
## 6.6. Experimento 6 - Caspase

Não houve diferença quanto à incidência de células positivas para caspase-3 ativa, analisada em embriões partenogênicos no 9º dia de cultivo (Tabela 8). Independente do tratamento utilizado e da idade ou tempo de maturação dos oócitos bovinos ativados partenogeneticamente a presença da caspase-3 ativa foi comprovada neste estágio embrionário. A associação do estrôncio ao tratamento ionomicina + 6DMAP não interferiu na proporção de morte celular estimada via caspase-3 ativa.

**Tabela 8.** Presença da Caspase-3 ativa em embriões partenogênicos bovinos ao nono dia de cultivo, oriundos de oócitos jovens e envelhecidos ativados com diferentes tratamentos

| <b>Tratamento</b> | <b>Tempo de Maturação (Idade)</b> | <b>N (embriões)</b> | <b>Nº Total de Cél (média ± erro)</b> | <b>Caspase -3 ativa (média ± erro)</b> |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------------------------|--|
| <b>ID</b>         | 22 h                              | 20/15               | 130,733 ± 9,868                       | 11,733± 1,928 <sup>a</sup>             |
| <b>IDS</b>        | 22 h                              | 20/16               | 101,438 ± 7,196                       | 12,250 ± 1,931 <sup>a</sup>            |
| <b>ID</b>         | 28 h                              | 20/15               | 105,933 ±15,096                       | 5,40 ± 1,090 <sup>a</sup>              |
| <b>IDS</b>        | 28 h                              | 20/13               | 97,071 ± 5,234                        | 8,538 ± 1,112 <sup>a</sup>             |

<sup>a,b</sup> Letras diferentes entre as colunas indicam significância entre os dados ( $p < 0,05$ ). A técnica foi realizada em 20 embriões de cada grupo, alguns a visualização na análise não foi clara, então esses embriões foram retirados da estatística.



\*\*\*

\*\*\***Figura 13.** Fotomicrografia de epifluorescência de embriões partenogenéticos ao nono dia de cultivo, produtos da ativação partenogênica de oócitos bovinos jovens e envelhecidos submetidos ao tratamento com 6DMAP sozinho e associado ao  $Sr^{2+}$ . Coluna da esquerda: coloração azul, com Hoechst 33342, coluna do meio, coloração vermelha com Rodamina e coluna da direita sobreposição de ambas. De cima para baixo foram formados trios para os grupos avaliados: controle negativo e os quatro tratamentos como controles positivos 1. Controle negativo, onde uma massa vermelha sem pontuação é característica. 2. Tratamento ionomicina + 6DMAP (ID22) na ativação de oócitos jovens, a positividade ficou pontualmente marcada. 3. Tratamento Ionomicina + [6DMAP+Sr] (IDS22) utilizado na ativação de oócitos jovens, positivamente marcado com pontos vermelhos definidos. 4. Tratamento ionomicina + 6DMAP (ID28) na ativação de oócitos envelhecidos, positivo. 5. Tratamento Ionomicina + [6DMAP+Sr] (IDS28) utilizado na ativação de oócitos envelhecidos, também positivo a presença da caspase 3 ativa.

#### 6.7. Experimento 7 - Expressão de Interferon-Tau (IFN- $\tau$ ) em Embriões Partenogenéticos

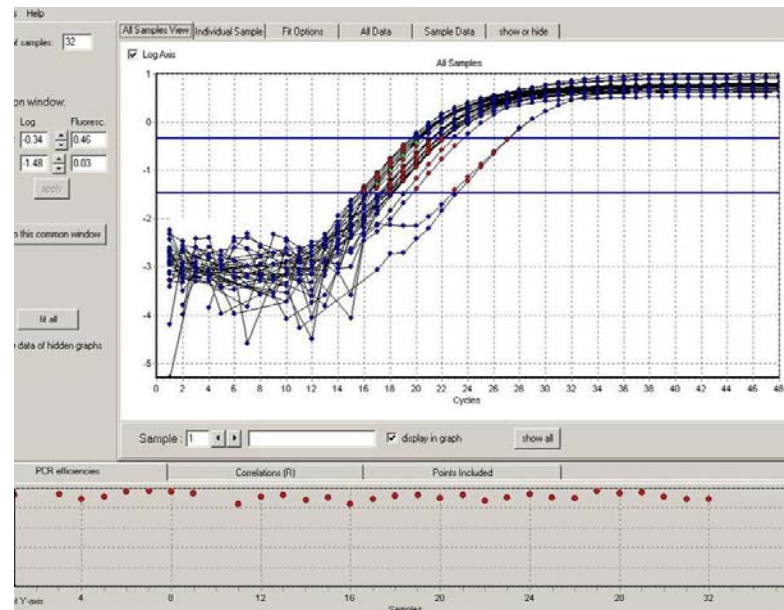
Para o cálculo da eficiência da reação foi utilizado o software *LinRegPCR* (RAMAKERS et al., 2003), onde o cálculo da eficiência é baseado na curva de amplificação individual de cada tubo ( $\Delta R_n$ ), como na figura 14.

Setenta e dois blastocistos eclodidos, coletados no 9º dia de cultivo embrionário, foram submetidos à síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa (RT-PCR) e em seguida realizada a quantificação em PCR em tempo real (PCR-RT). As médias de cada tratamento e o erro padrão estão demonstradas na tabela 9 e observa-se semelhança na expressão relativa do gene IFN- $\tau$  entre os tratamentos utilizados em oócitos jovens e envelhecidos. Independente da idade do oócito (tempo de maturação) e do tratamento ativador utilizado para a produção de embriões *in vitro*, o IFN- $\tau$  é expresso no estágio de blastocisto. A adição de estrôncio ( $Sr^{2+}$ ) ao tratamento ionomicina e 6-dimetilaminopurina não interferiu na expressão do IFN- $\tau$  em embriões bovinos partenogenéticos.

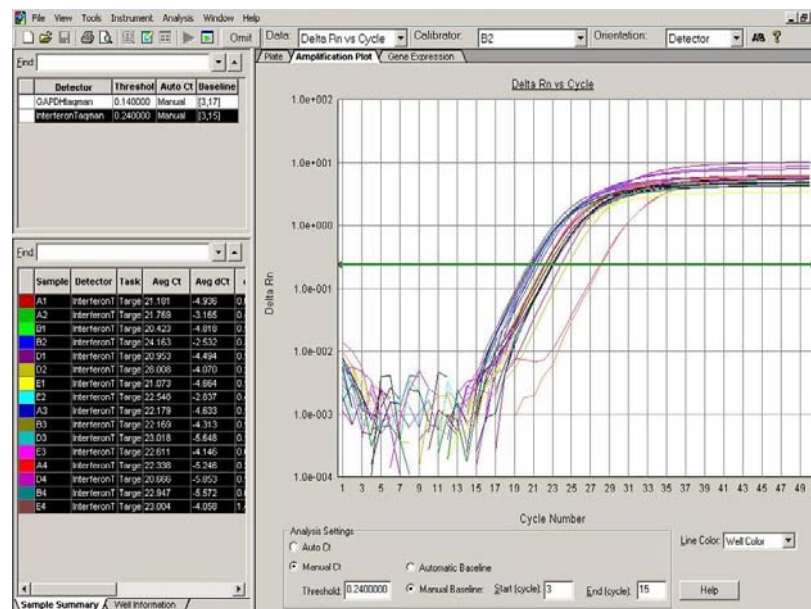
**Tabela 9.** Expressão Relativa de IFN- $\tau$  em embriões partenogênicos quantificada por PCR em tempo real (PCR-RT)

| <b>Tratamentos*</b> | <b>Tempo de Maturação<br/>(Idade)</b> | <b>Expressão Relativa de IFN-<math>\tau</math><br/>(média <math>\pm</math> erro padrão)</b> |
|---------------------|---------------------------------------|---|
| <b>ID</b>           | 22 h                                  | -2,7347 $\pm$ 0,61095 <sup>a</sup>  |
|                     | 28 h                                  | -2,1552 $\pm$ 0,61095 <sup>a</sup>  |
| <b>IDS</b>          | 22 h                                  | -2,7840 $\pm$ 0,61095 <sup>a</sup>  |
|                     | 28 h                                  | -2,1816 $\pm$ 0,61095 <sup>a</sup>  |

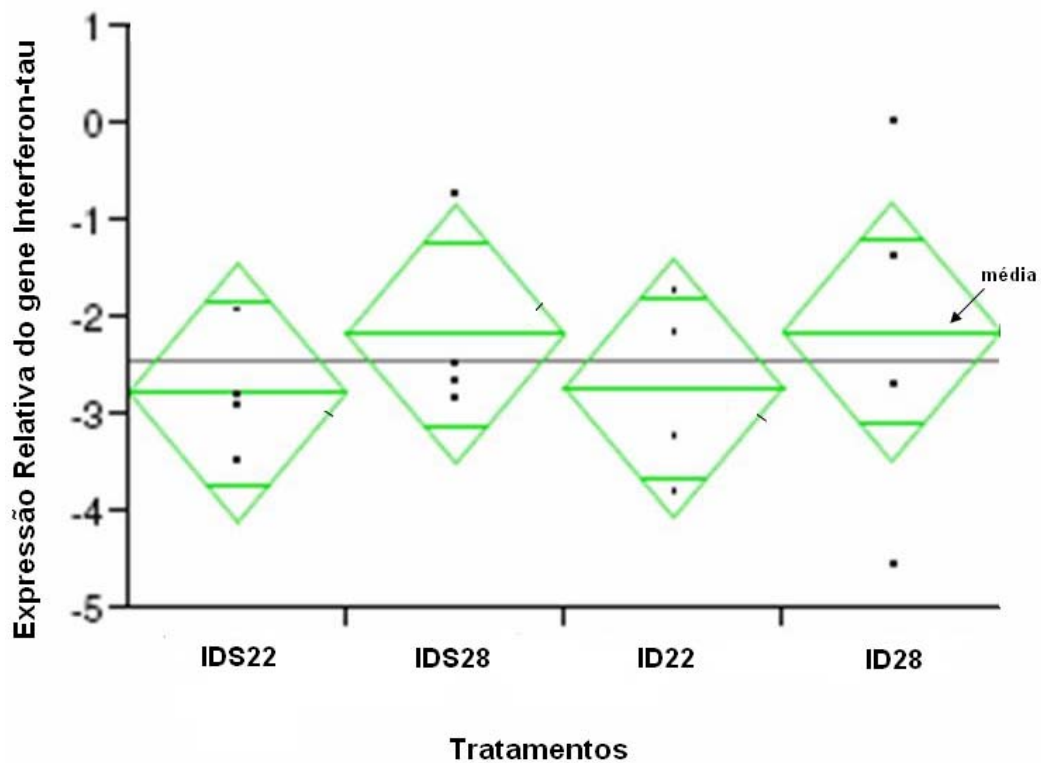
<sup>a</sup> Letras iguais sobrescritas em uma mesma coluna indicam que os dados não diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Independente do tratamento e do tempo de maturação a expressão relativa foi maior que a expressão do gene endógeno.\* Tratamentos: ID: ionomicina (5  $\mu$ M por 5 min)+ 6DMAP (2mM por 3 h); IDS - ionomicina (5  $\mu$ M/ 5 min )+ (2mM de 6DMAP + 20 mM de Sr<sup>2+</sup>) por 6 h. Os tratamentos foram os mesmos para ativar tanto oócitos jovens como envelhecidos.



**Figura 14.** Exemplo de análise da curva de eficiência para cada poço individual através do software “LinRegPCR”, onde as linhas azuis horizontais do gráfico superior indicam intervalo analisado da curva de amplificação em sua fase exponencial, e o gráfico inferior mostra as eficiências calculadas



**Figura 15.** Exemplo de análise realizada no programa “7500 System SDS Software” com a ilustração do “threshold” calculado (linha verde). Amplificação relativa do gene do IFN- $\gamma$  em relação ao GAPDH ou gene endógeno.



**Figura 16.** Distribuição dos dados normalizados para IFN- $\tau$  em blastocistos eclodidos bovinos partenogenéticos, ativados com tempo de maturação de 22 h e 28 h com os tratamentos: Ionomicina + 6DMAP 22h (ID22); Ionomicina + 6DMAP + estrôncio 22 h (IDSr22); Ionomicina + 6DMAP 28 h (ID28); Ionomicina + 6DMAP + estrôncio (IDS28). Cada ponto representa pool de seis blastocistos eclodidos, coletados no nono dia de cultivo embrionário. A seta localiza a linha das médias normalizadas em função do logaritmo da expressão relativa do gene interferon-tau em cada tratamento avaliado.

## 7. RESUMO DOS RESULTADOS

- Taxa de Ativação: Oócitos envelhecidos apresentaram melhores médias comparados aos jovens. Não houve diferença entre os tratamentos dentro do grupo envelhecidos; entretanto no grupo dos jovens, a combinação IDSS resultou em piores taxas ( $p < 0,05$ ).
- MPF e MAPK: Tanto MPF como MAPK apresentaram maior atividade em oócitos jovens em comparação aos envelhecidos. A adição do  $Sr^{2+}$  não modificou a atividade de ambas cinases.
- Desenvolvimento embrionário: Com um tempo de incubação de 6 h, o tratamento com ID associado ou não ao  $Sr^{2+}$  aumentou às taxas de clivagem quando utilizado para ativar oócitos jovens. O resultado obtido com o uso do ID sem  $Sr^{2+}$  e por 6 h superou os resultados obtidos com os demais tratamentos utilizados em oócitos envelhecidos, enquanto que associado ao  $Sr^{2+}$  resultou em taxas equivalentes as obtidas no grupo de oócitos envelhecidos. Oócitos envelhecidos apresentaram maiores taxas de blastocistos em comparação aos jovens. A incubação por 6 h com o tratamento ID combinado ou não ao  $Sr^{2+}$  para ativar oócitos jovens, foi suficiente para igualar as taxas de desenvolvimento à blastocisto obtidas com oócitos envelhecidos.
- Qualidade dos embriões: O tratamento IDSS usado na ativação de oócitos envelhecidos apresentou menor média no número total de células. O tratamento ID por 6 h mostrou uma tendência a produzir mais blastocistos, porém com qualidade inferior (menos células). O tratamento ID incubado por 3 h (padrão) para ativação de oócitos bovinos jovens, mostrou-se o melhor comparado aos demais estudados, no critério de qualidade avaliada pelo número total de células.
- Fragmentação Nuclear: Embriões oriundos de oócitos jovens ativados partenogeneticamente apresentaram maior taxa de fragmentação nuclear, avaliada pela técnica de Tunel, comparados aos embriões oriundos de oócitos envelhecidos. Não houve efeito do tratamento utilizado em relação às taxas de fragmentação.



- Caspase-3 ativa: Pela técnica de imunocitoquímica, foi constatada a presença de caspase-3 ativa tanto em embriões bovinos oriundos de oócitos jovens como de oócitos envelhecidos ativados partenogeneticamente. Não houve efeito do tratamento utilizado.
- IFN- $\tau$ : Embriões partenogenéticos bovinos no estágio de blastocisto eclodido, ao nono dia de cultivo, expressaram IFN- $\tau$  independente do tratamento e do tempo de maturação.

## 8. DISCUSSÃO

Trabalhos envolvendo ativação partenogenética de oócitos jovens e envelhecidos ganharam importância por representarem ferramentas para estudos de ciência básica (potencial de desenvolvimento) e para a biotecnologia (produção de embriões clonados).

A técnica para produção de embriões mamíferos por partenogênese teve dois marcos importantes. O primeiro foi o uso do etanol (Nagai, 1987) como agente capaz de ativar o oócito com baixa eficiência, até que outras substâncias foram usadas associadas ou não, com mecanismos de ação diferentes e com resultados superiores. O envelhecimento do oócito e o uso de drogas como a ionomicina (LOI et al., 1998) e o estrôncio (CUTHBERTSON et al., 1981) associados a inibidores de síntese protéica como o ciclohexamida (NUSSBAUM e PRATHER, 1995) ou inibidores de fosforilação como o 6-dimetilaminopurina (SUSKO-PARRISH et al., 1994), fizeram parte do segundo marco e foram os grandes responsáveis por viabilizar a produção clones em mamíferos. Entretanto a clonagem é frequentemente descrita com taxas variáveis de desenvolvimento, possivelmente relacionadas a potenciais diferentes de reprogramação das células pelo oócito.

Existem alguns fatores limitantes no processo de indução da ativação, entre eles, é possível citar a dependência do tempo de maturação ou idade dos oócitos (BARNES et al., 1993; SOLOY et al., 1997). Estudos mostram que o envelhecimento do oócito, que ocorre entre 28 e 32 horas, favorece a ativação, mas compromete o desenvolvimento embrionário. O envelhecimento promove o decréscimo da atividade das cinases MPF e MAPK, e é necessário para o oócito sair do bloqueio em MII.

Oócitos envelhecidos são mais rápidos em ultrapassar esse bloqueio, resultando em altas taxas de ativação (WU *et al.*, 1997; KIKUCHI *et al.*, 2000). Entretanto, os oócitos jovens não respondem de maneira satisfatória ao processo de ativação (TANAKA & KANAGAWA, 1997). Acredita-se que estes tenham potencial de desenvolvimento maior e a capacidade de restabelecimento das cinases reguladoras do ciclo celular, também seja maior, o que torna variável a resposta à ativação. Durante o envelhecimento do oócito é possível que componentes protetores presentes no citoplasma sejam degradados ou inativados, levando o oócito à incompetência do desenvolvimento e à morte. Acredita-se que as oscilações de  $Ca^{2+}$  desencadeadas no processo de fecundação e ativação do oócito possam também estar envolvidas na sinalização da apoptose quando iniciadas em oócitos envelhecidos pela resposta dos componentes citoplasmáticos (GORDO *et al.*, 2002).

Nossos resultados demonstraram uma menor taxa de ativação nos oócitos jovens ( $57,279 \pm 3,68$ ) em relação aos envelhecidos ( $71,403 \pm 3,36$ ), como já descrito na literatura (BARNES *et al.*, 1993; BORDIGNON e SMITH, 1998; KIKUCHI *et al.*, 2000; TIAN *et al.*, 2002). A menor taxa de ativação pode ser justificada pela alta atividade de MPF e MAPK que ocorre nos oócitos jovens. KIKUCHI e colaboradores em 2000, estudando ativação partenogênica em oócitos de suínos, avaliaram a relação do MPF e envelhecimento e constataram que oócitos envelhecidos apresentavam melhor taxa de ativação e alta taxa de fragmentação após a ativação. O envelhecimento provoca um acúmulo de pré-MPF via desequilíbrio na atividade das cinases como a Wee 1, que acelera a fosforilação da  $p34^{cdc2}$  na extremidade tirosina e treonina, resultando em acúmulo de pré-MPF. Tian e colaboradores, 2002 estudaram a associação do MPF, MAPK e dinâmica da progressão nuclear durante a ativação de oócitos bovinos jovens (20 h de MIV) e envelhecidos (40 h de MIV) e observaram que oócitos envelhecidos apresentam menor atividade tanto de MPF quanto de MAPK e a redução na atividade após ativação é mais rápida, enquanto que oócitos bovinos jovens apresentaram maior atividade e o decréscimo das cinases é mais lento.

Neste estudo, a inativação do MPF, à semelhança dos nossos resultados, precedeu a inativação da MAPK em aproximadamente 4 h. Nossos dados corroboram com a afirmação de que oócitos bovinos envelhecidos apresentaram maior taxa de ativação e menor atividade tanto da MPF quanto de MAPK. Mostrou-

se uma atividade de aproximadamente 3x maior de MAPK antes da ativação em oócitos jovens. Para o MPF esta atividade foi semelhante entre as idades (22 h e 28 h) no momento da ativação. O tratamento ID levou a uma redução nos níveis de MPF nas três primeiras horas de maneira equivalente aos oócitos jovens e envelhecidos. Deste momento em diante, nos oócitos envelhecidos a atividade foi gradualmente reduzida, enquanto que nos oócitos jovens, ela se manteve. A MAPK teve sua atividade reduzida gradualmente tanto em oócitos jovens como em envelhecidos após o estímulo da ativação. Oócitos envelhecidos apresentaram níveis menores, em comparação aos jovens, em todos os intervalos durante o período de ativação, com razão de aproximadamente 2/3 às 3 h, 1/3 às 6 h e 1/8 às 10 h, esses dados podem justificar a menor taxa de ativação dos oócitos jovens. Justificam também a variação nas taxas de blastocisto que foi menor em oócitos jovens ativados partenogeneticamente ( $p=0,004$ ). Entretanto, os grupos tratados com ionomicina + 6DMAP (ID) sozinho ou associado ao  $Sr^{2+}$  (IDS) incubado por um período de 6 h, não diferiram dos demais tratamentos com oócitos envelhecidos. Quando comparamos o tratamento ID pelo período de incubação de 3 h ou 6 h, os melhores resultados em taxa de clivagem, 8 células e blastocistos foram obtidos com 6 h de incubação. A associação [6DMAP+Sr] 6 h, não mostrou vantagem em comparação ao uso do 6DMAP isolado e pelo mesmo tempo de incubação. Estes dados somados aos resultados de taxa de blastocisto, que mostra melhor o desempenho do tratamento IDS e ID por 6h, indicam que a manutenção do oócito na presença do inibidor de fosforilação como o 6DMAP, por um período adicional de 3 h, favoreceu o desenvolvimento a blastocisto nestes oócitos. Esta maior taxa pode ser justificada pela manutenção de menores níveis de MAPK e MPF conforme observado para o grupo IDS até o período de 6 h (Figura 8 e 9). Os resultados obtidos permitem concluir que o tratamento ID usado com tempo de incubação de 6 h, é mais eficiente para a ativação de oócitos jovens, enquanto que em oócitos envelhecidos o tratamento ID com incubação de 3 h já é eficiente para ativá-los independente da utilização do estrôncio. O menor número de células, encontrado nos embriões oriundos de oócitos tratados com 6DMAP por 6 h pode ser relacionado a dois aspectos: i) toxicidade da droga, que será discutido posteriormente, e ii) tempo para o desenvolvimento, um atraso de atraso de 3 h no desenvolvimento representa, em ciclos celulares, neste experimento de 30 h/ciclo o equivalente a 0,1 ciclo celular, que poderia justificar uma diferença de até 10% no número de células

no estágio de blastocisto eclodido.

Contrariamente ao que encontramos na literatura, os embriões oriundos de oócitos jovens ativados partenogeneticamente apresentaram maior taxa de fragmentação nuclear avaliada pela técnica de Tunel.

Baseado nos critérios de morfologia e na fragmentação do DNA, a apoptose é um fenômeno necessário em embriões bovinos para a formação da blastocèle (Matwee et al., 2000). Quando comparamos a taxa de células apoptóticas com os resultados obtidos no experimento 3, onde foi avaliado o desenvolvimento embrionário, é digno de nota que as taxas de eclosão dos blastocistos produzidos não diferiram entre tratamentos e tampouco entre as idades dos oócitos. Este fato nos leva a repensar a função da MCP para avaliar a qualidade dos embriões. Embora a apoptose seja observada durante o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos tanto *in vivo* como *in vitro*, pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares envolvidos (PARDO-VELEZ et al., 2007).

A ativação partenogenética não causa apoptose, mas a formação haplóide aumenta a ocorrência da apoptose em embriões na fase de pré-implantação (LIU et al., 2002). Wang e colaboradores em recente estudo em 2007, mostraram que o uso do tratamento ativador ionomicina + 6DMAP resulta em índices mais altos de apoptose em blastocistos partenogenéticos bovinos. Esta associação apresentou alta frequência de haploidia que pode ser uma razão para altos índices de apoptose nos blastocistos. Enquanto que o tratamento etanol + ciclohexamida + citocalasina B (CB) além de apresentar menor incidência de apoptose, melhorou as taxas de clivagem, desenvolvimento a blastocisto e número total de células destes blastocistos produzidos. São necessários mais estudos ou experimentos para verificar a influência da idade do oócito e a combinação etanol + ciclohexamida + CB para ativação oocitária. Em bovinos, erros de ploidia são frequentemente observados na produção *in vitro* de embriões (VIUFF et al., 2000), em embriões partenogenéticos (WINGER et al., 1997) e em embriões reconstruídos por TN (BOOTH et al., 2003). O resultado desse estudo inicial têm revelado uma crescente incidência de anormalidades cromossômicas como: a haploidia, a mixoploidia e a poliploidia no tratamento com 6DMAP em embriões bovinos (AVERY et al., 1998; RHO et al., 1998). Por exemplo, o tratamento 6-DMAP em *Salmonella Typhimurium*, tem efeito mutagênico e os resultados obtidos sugerem essa possibilidade em células de mamíferos (KATOH et al., 2004).

As caspases 3, 6, 7 e 9 estão presentes desde o estágio de zigotos com 4 células até o estágio de mórula. Porém a ativação destas caspases não foi detectada em oócitos maduros tampouco em embriões competentes. Esses resultados concordam com Martinez et al., 2002, em estudos com embriões humanos, não foi detectada atividade das caspases em embriões iniciais saudáveis ou competentes. No nosso trabalho, os resultados das técnicas de Tunel e Caspase-3 ativa, utilizados para avaliar morte celular concordaram que as maiores médias de células apoptóticas foram encontradas no grupo de embriões partenogênicos oriundos de oócitos jovens. Embriões bovinos partenogênicos, no estágio de blastocisto, apresentam caspase-3 ativa independente do tratamento ativador e do tempo de maturação (idade). Quanto à fragmentação nuclear, houve efeito do tratamento e do tempo de maturação dos oócitos. Contrariamente ao que se esperava, o grupo dos oócitos jovens apresentou taxa de fragmentação maior que a encontrada no grupo dos envelhecidos. Entre os tratamentos, dois apresentaram médias inferiores aos demais. O tratamento IDSS, usado na ativação de oócitos envelhecidos e o tratamento ID incubado por 6 h na ativação de oócitos jovens.

A maturação de oócitos *in vitro* (MIV), é amplamente usada em avançadas tecnologias reprodutivas como a fertilização *in vitro*, injeção espermática e clonagem por transferência nuclear. O controle da idade do oócito pode ter muitas vantagens para estes procedimentos, inclusive a organização de protocolos em horários mais convenientes (BOGLIOLO et al., 2000; FAN & SUN., 2004; KOO et al., 2005). Neste estudo foi demonstrada a possibilidade de ativar oócitos jovens com taxas semelhantes aos oócitos envelhecidos desde que tratados com 6-DMAP por 6 h.

Embriões partenogênicos e clones apresentam má formação placentária e essa deficiência pode ser explicada pela ausência da contribuição do espermatozóide tanto na formação, diferenciação celular, quanto na transcrição do embrião recém formado (OSTERMEIER et al., 2004).

De acordo com Kubisch e colaboradores (2003) o embrião partenogênico possui menor número de células comparado com o embrião produzido por fecundação *in vitro* e as células do trofoblasto responsáveis pela produção do IFN- $\tau$  estão localizadas em maior concentração adjacente a massa celular interna (JOHNSON et al., 2005). Estes autores relataram diferença entre os tratamentos utilizados e entre o tempo de maturação dos oócitos. Nossos resultados no entanto discordam de tal afirmação. Vários estudos relacionados a aspectos do

reconhecimento materno da gestação foram desenvolvidos utilizando ensaios de atividade antiviral como indicativo da secreção de IFN- $\tau$ . Estes estudos mostraram que embriões que alcançaram o estágio de blastocisto mais rapidamente, produziram maiores quantidades de IFN- $\tau$  em relação ao grupo que desenvolveu mais lentamente (KUBISCH et al., 2003). Vários trabalhos têm mostrado os fatores que interferem a produção de IFN- $\tau$  em blastocistos bovinos (KUBISCH et al., 1998; LARSON et al., 2001, BINELLI et al, 2000). Sugerindo que a produção de IFN- $\tau$  é um bom indicativo de qualidade dos embriões produzidos.

Para mensurar a expressão de IFN- $\tau$ , foi realizado a quantificação relativa do mRNA pela RT-PCR em Tempo Real em blastocistos eclodidos no 9º dia, e os resultados obtidos nesse trabalho estão de acordo com o descrito anteriormente (LARSON et al., 2001; RASMUSSEN e JOHNSON, 2003; KUBISCH et al., 2003). Em nosso estudo a expressão relativa do IFN- $\tau$  em embriões bovinos partenogênicos, não diferiu entre os diferentes tratamentos utilizados na ativação dos oócitos e tampouco do tempo de maturação dos oócitos ativados jovens e envelhecidos.

Em suma, oócitos jovens precisam de tempo de incubação mais prolongado quando submetidos ao 6DMAP para promover taxa de desenvolvimento semelhante a obtida com oócitos envelhecidos. Não houve vantagem da utilização do estrôncio para ativação de oócitos bovinos jovens ou envelhecidos em termos de qualidade dos embriões produzidos. Oócitos jovens não resultaram em embriões de melhor qualidade. Todavia, este estudo limitou-se a estimar o potencial de desenvolvimento após a ativação, não levando em consideração capacidade de reprogramação nuclear necessária para a produção de embriões clonados.

Embora muitas espécies de mamíferos sejam clonadas com sucesso pela transferência nuclear, a eficiência no desenvolvimento dos neonatos ainda é baixa. Sendo assim, experimentos futuros com o objetivo de avaliar o efeito da utilização de oócitos jovens e reprogramação seriam fundamentais para responder muitas questões envolvidas não só com a clonagem, mas com a produção de embriões *in vitro* e o efeito mutagênico de substâncias químicas usadas para produzir embriões clonados.

## 9. CONCLUSÕES

- O uso do estrôncio para ativar partenogeneticamente oócitos bovinos jovens, não melhorou as taxas de ativação e tampouco o desenvolvimento embrionário.
- A ativação de oócitos jovens permite resultados de desenvolvimento embrionário similares aos obtidos com oócitos envelhecidos com a associação ID com um tempo de incubação adicional de 3 h.
- Oócitos jovens ativados partenogeneticamente às 22 h não produziram blastocistos de melhor qualidade em comparação aos oócitos envelhecidos (28 h), avaliados pelas técnicas de Tunel e imunocitoquímica para caspase-3 ativa (apoptose) e a expressão de IFN- $\tau$  mensurada por PCR em tempo real.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIEU, A.; DORÉE, M.; FISCHER, D. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. **Journal of Cell Science**, London, v.114, p.257-267, 2001.

ALBERTINI, D.F.; SANFINS, A.; COMBELLES, C. M. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. **Reproduction Biomed Online**, Cambridge, v.6, p.410-415, 2003.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002. 1463 p.

ALI, A.; SIRARD, M.A. Protein Kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. **Reproduction**. Cambridge, v.130, p. 303-310, 2005.

EVERY, B. et al. Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylaminopurine prior to *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction and Developmental**, Hoboken, v. 50, p. 334-344, 1998.

BANZATTO, O. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006.

BARNES, F. L. et al. Embryo cloning in cattle: the use of *in vitro* matured oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge, v.97, p.317-320, 1993.

BEATTY, R.A. Parthenogenesis and polyploidy in mammalian development. Cambridge: Cambridge University Press, 1957.

BEVERS, M.M. et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**. New York, v.47, p.13-22, 1997.

BILODEAU- GOESEELS, S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. **Theriogenology**. Los Altos, v. 60, p. 1679-1690, 2003.



BINELLI, M. et al. Interferon- $\gamma$  Modulates phorbol ester-induced production of prostaglandin and expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase-A2 from bovine endometrial cells, **Biology of Reproduction**. Champaign, v.63,p.417-424, 2000.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. Hoboken, v.41, p.54-62, 1995.

BOGLIOLO, L. et al. Activity of maturation promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase(MAPK) after parthenogenetic activation of ovine oocytes, **Cloning**. New York, v.2, n. 4, 2000.

BOOTH, P. J. et al. Numerical Chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, New York, v.68, p. 922-928, 2003.

BORDIGNON, V.; SMITH L.C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.49, p. 29-36, 1998.

BORDIGNON, V.; SMITH, L. Clonagem Animal por Transferência Nuclear. In: GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 10. ed. São Paulo: Varela, 2002.

BRATTON, S.B. et al. Protein complexes activate distinct caspase cascades. In death receptor and stress-induced apoptosis. **Experimental Cell Research**, New York, v.256, p. 27-33, 2000.

BREVINI GANDOLFI, T.A.L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, p.1255-1276, 2001.

CHOI, T. et al. Activation of p34<sup>cdc2</sup> protein kinase in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. **Development**, Cambridge, v.113, p. 789-795, 1991.

CHRISTMANN, L.; JUNG, T.; MOOR, R.M. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. **Molecular Reproduction Development**, Hoboken v.38, p.85-90, 1994.

COLLAS et al., Histone H1 Kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. **Molecular Reproduction Development**, Hoboken, v.34, p.224-231, 1993.

COLLAS et al., Inactivation of histone H1 Kinase by  $Ca^{2+}$  in rabbit oocytes. **Molecular Reproduction Development**, Hoboken, v.40, p.253-258, 1995.

COTICCHIO G. et al. What criteria for the definition of oocyte quality? **Annual NY Academy Science**, v.1034, p.132-144, New York, 2004.

CUTHBERTSON et al., Free  $Ca^{2+}$  increases in exponential phases during mouse oocyte activation. **Nature**, London, v. 294, p. 754-757, 1981.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal Animal Science**, v. 25, n. 3, p. 800-805, 1966.

EVERS, P. A. et al. Regulation of the G<sub>2</sub>/M transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. **The Journal of biological chemistry**, Bethesda, v. 280, p.24339-24346, 2005.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.42, p.437-442, 1995.

FAN, H.F., SUN, Q.Y. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biology of Reproduction**. Champaign, v.70, p.35-547, 2004.

FISSORE, R. A. et al. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**, Cambridge, v.124, p.745-754, 2002.

FOULADI NASHTA, A. A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K. H. S. Maintenance of Bovine Oocytes in Meiotic Arrest and Subsequent Development In Vitro: A Comparative Evaluation of Antral Follicle Culture with Other Methods, **Biology of Reproduction**, Champaign, v.59, p.255–262, 1998.

GALLI, C. et al. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. **Nature**, London, v.424, p.635, 2003.

GORDO, A.C. et al. Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in *In vitro* aged mouse eggs. **Biology of Reproduction**, Champaing, n. 66, p. 1828-1837, 2002.

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

GRUPEN, C. G., NOTTLE, M. B., NAGASHIMA, H. Calcium release at fertilization: artificially mimicking the oocytes response to sperm. **Journal of Reproduction and Development**, v. 48, n. 4, 2002.

HAJNÓCZKY, G.; DAVIES, E.; MADESH, M. Calcium signaling and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, n.304, p.445-454, 2003.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growt, capacitation and final maturation in cattle, **Theriogenology**, Los Altos, v.47, n.1, p. 23-32, 1997.

HYTTEL, P. Nucleolus formation in pre-implantation cattle and swine embryos. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, Firenze, v.106, n.2, p. 109-117, 2001.

HILL, J. R. et al. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in firsttrimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, New York, v.63, p.1787-1794, 2000.

HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v.45, p.353-361, 2005.

JOHNSON, M. H. The problematic in-vitro embryo in the age of epigenetics. **Reproduction Biomed Online**, suppl. 1, p.88-96, 2005.

JONES, K., T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v.10, p.1-5, 2004.

KATOH, M. et al. 6-dimethylaminopurine (6DMAP), which is used to produce most cloned animals, is mutagenic in *Salmonella typhimurium* TA1535, **Mutation Research**, Amsterdam, v.560, p. 199-201, 2004.

KIKUCHI, K. et al. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro* . **Journal of Reproduction Fertility**, v.105, p. 325-330, 1995.

KIKUCHI, K. et al. Maturation/M-Phase Promoting Factor: A Regulator of Aging in Porcine Oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaing, v.63, p.715-722, 2000.

KLINE, D.; KLINE, J. Repetitive calcium transients and rate of calcium in exocytosis and cell activation in the mouse eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.42, suppl., p. 80-89, 1990.

KOO, D, B.; CHAE, J.I.; KIM, J.S.; WEE G.; S.B.S.. Inactivation of MPF and MAP Kinase by Single Electrical Stimulus for Partenogenetic Development of Porcine Oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.72, p. 542-59, 2005.

KRISCHEK, C.; MEINECKE, B. *In vitro* maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNA coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.73, p.129-140, 2002.

KUBELKA, M. et al. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, Champaing, v.62, p.292-302, 2000.

KUBISCH, H.M.; LARSON, M.A.; ROBERTS,R,M. Relationship between age of blastocyst formation and interferon-tau secretion by in vitro-derived bovine embryos **Molecular Reproduction And Development**, New York, v.49, p. 254-260, 1998.

KUBISCH, H.M., RASMUSSEN, T.A., JOHNSON, K.M., Interferon-tau in bovine blastocysts following parthenogenetic activation of oocytes: Pattern of secretion and polymorphism in expressed mRNA sequences. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 64, p. 79-85, 2003.

KÜHHOLZER, B., PRATHER, R.S. Advances in livestock nuclear transfer. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 224, p. 240 -245, 2000.

KUMAGAI, A.; DUNPHY, W.G. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. **Cell**, New York, v.70, p.139-151, 1992.

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

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARSON, M. et al. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN- $\tau$ . **Developmental Biology**, v.98, n.17, p.9677-9682, 2001.

LEAL, C.L.V., MÉO, S.C., GARCIA, J.M. Activation of bovine oocytes by strontium combined or not with an electric pulse. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n.3, p. 35-46, 2003.

LEAL, C.L.V., MÉO, S.C., GARCIA, J.M. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v.81, p.35-46, 2004.

LIU, L.; KEEFE, D. L. Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. **Biology of Reproduction**, Cambridge, v. 62, p.1828–1834, 2000.

LOI, P. et al. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. **Biology of Reproduction**, Cambridge, v. 58, p.1177-1187, 1998.

MALLER, J.L. Biochemistry of cell cycle checkpoints at the G2/M and metaphase/anaphase transitions. **Seminars in Developmental Biology**, v.5, p.183-190, 1994.

MARTINEZ, F. et al. Caspase activity in preimplantation human embryos is not associated with apoptosis, **Human Reproduction**, Oxford, v.17, p.1584–1590, 2002.

MEHLMANN, L. M.; JONES, T. L.; JAFFE, L. A.; Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. **Science**, Washington, v.297(5585), p.1343-1345, 2002.

MEIRELLES et al. Transferência de núcleo: potenciais aplicações no controle genético nuclear e citoplasmático. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p. 382-390, 2007. Disponível em: <[www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)>. Acesso em: 4 ago. 2007.

MEIRELLES et al. Desafios para a clonagem comercial- planejando o futuro. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.34, supl 1, p.235-242, 2006.

MÉO, S.C., LEAL, C.L.V., GARCIA, J.M. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v.81, p.35-46, 2004.

MATWEE, C.; BETTS, D.H.; AND KING, A. W. Apoptosis in the early bovine embryo, **Zygote**, v. 8, pp. 57–68, 2000.

MIYAZAKI, S. Cell signaling at fertilization of hamster eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v.42, suppl., p.163-175, 1990.

NAGAI, T., Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol. **Gam. Res.** v.16, p.243–249, 1987.

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

OSTERMEIER, G.C. et al. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. **Nature**, London, v,429, p,154, 2004.

OTAEGUI, P.J.; O'NEILL, G.T.; WILMUT, I. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by exposure to strontium as a source of cytoplasts for nuclear transfer. **Cloning**, Larchmont, v.1, p. 111-117, 1999.

OZIL, J.P. Role of calcium oscillations in mammalian egg activation: experimental approach. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v.5, n.72, p.141-152, 1998.

OZIL, J.P. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile stimulation. **Development**, Cambridge, v.109, p.117–127, 1990.

PANARACE, M. et al. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. **Theriogenology**, Los Altos, v.67, p.142-151, 2007.

PARDO-VELEZ, C. et al. Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-KB and p53 activation in bovine embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, p.1285-1296, 2007.

PINES, J.; HUNTER, T. Human cyclin A and B1 are differentially located in the cell-cycle dependent nuclear transport. **Journal of Cell Biology**, New York, v.115, p.1-17, 1991.

RAMAKERS, C. et al. Assumption- free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v.339, p.62-66, 2003.

RICHARDS, J. S.; JONASSEN, J.A.; KERSEY, K. Evidence that changes in tonic luteinizing hormone secretion determine the growth of preovulatory follicles in the rat. **Endocrinology**, Baltimore, v.107, p. 641-648, 1980.

ROH, S. et al. Parthenogenetic activation of rat oocytes and their development *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**. Melbourne, v.15, p.135-140, 2003.

RHO, G.J.; WU, B.; KAWARSKY, S.; LEIBO, S.P.; BETTERIDGE, K.J. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. **Molecular Reproduction and Development**. New York, v.50, p. 485-492, 1998.

SAS, Statistical Analyses System Institute "SAS USER´S GUIDE: Statistic". SAS institute INC., Cary, NC, 1995.

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

SIRARD, M. A. et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Cambridge, v.40, n.6, p.1257–1263, 1989.

SIRARD, M. A.; COENEN, K. Effects of inhibition of meiotic resumption upon the subsequent development of bovine oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v.41, p.255-262, 1994a.

SCHEFE, J. H. et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's Ct difference" formula. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v.84, p.901-910, 2006.

SOLOY, E. et al. Establishment of the block against sperm penetration in parthenogenetically activated bovine oocytes matured in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.111, p.151-157, 1997

SOLOY, E. et al. Time course of pronuclear deoxyribonucleic acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.57, p.27-35, 1997.

STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L.; ABRAHAMS, V. M.; MOR, G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v.26, p.877-897, 2005.

SUSKO-PARRISH, J. L. et al. Inhibition of protein kinase after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. **Development Biology**, San Diego, v.166, p.729-739, 1994,

TATCHER, W.W. et al. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**. Los Altos, v.56, p.1435-1450, 2001.

TANAKA, H.; KANAGAWA, H. Influence of combined activation treatments on the success of bovine nuclear transfer using young or aged oocytes. **Animal Reproduction Science**. v.5, n.49, p.113-23, 1997.

THOMPSON, C.B. Apoptosis. In: PAUL, W.E. (Ed.) **Fundamental immunology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p.813-829.

THIEBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world, **Data Retrieval Committee Annual Report**. Disponível em: <[www.iets.org/pdf/data\\_retrivial/december2004.pdf](http://www.iets.org/pdf/data_retrivial/december2004.pdf)>. Acesso em 03 ago. 2007.

TIAN, X. C. et al. Association of MPF, and Nuclear Progression Dynamics During Activation of Young and Aged Bovine Oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. New York, v.62, p. 132-138, 2002.

VAN WEZEL E RODGERS. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. **Biology of Reproduction**, Cambridge, v.55, p.1003-11, 1996.



VITULO, A. D., OZIL, J.-P. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. **Developmental biology**, San Diego, v.151, p.128-136, 1992.

VIGNERON, C. et al. Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.69, p.457-465, 2004.

VIUFF, D. et al. D. Chromosome aberrations in *in vitro*-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination. **Biology of Reproduction**, New York, v. 63, p. 1143-1148, 2000.

WANG, Z-G. et al. Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, 2007. In Press

WASIELAK, M.; BOGACKI, M. Apoptosis inhibition by IGF-I during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, 2006.

WATANABE, M. R. et al. Ultrasound guided oocytes recovery in Nellore cows and *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, n.1, p. 438, 1999.

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

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

WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, London, v.385, p.810-813, 1997.

WINGER, Q.A. et al. Bovine parthenogenesis is characterized by abnormal chromosomal complements: implications for maternal and paternal co-dependence during early bovine development. **Developmental Genetics**, New York, v.2, p.160-166, 1997.

WU, B. et al. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.56, p.253-259, 1997.