

ALEXANDRE BARRETO DE ALMEIDA

**Sistema biológico de aumento da taxa de prenhez.  
Embriões partenogénéticos podem ajudar o  
reconhecimento materno da gestação**

**São Paulo  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALEXANDRE BARRETO DE ALMEIDA

**Sistema biológico de aumento da taxa de prenhez.  
Embriões partenogênicos podem ajudar o  
reconhecimento materno da gestação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira

São Paulo  
2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

8/p  
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
E ZOOTECNIA DA USP  
21/7/08

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2016  
FMVZ

Almeida, Alexandre Barreto de

Sistema biológico de aumento da taxa de prenhez. Embriões partenogênicos podem ajudar o reconhecimento materno da gestação / Alexandre Barreto de Almeida. – São Paulo : A. B. Almeida, 2008.  
88 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.  
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira.

1. Partenogênicos. 2. Interferon tau. 3. Reconhecimento materno.  
4. Taxa de prenhez. 5. Bovinos. I. Título.



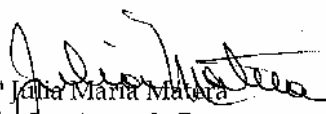
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
*Comissão Bioética*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Sistema biológico de aumento da taxa de prenhez. Embriões partenogênicos podem ajudar o reconhecimento materno da gestação?", protocolo nº588/2004, utilizando 70 bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Biological method to improve pregnancy rate. Can parthenotes embryos improve maternal recognition?", protocol number 588/2004, utilizing 70 bovine, under the responsibility of Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 21 de dezembro de 2004

  
Profª Drª Julia Maria Matara  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

**FOLHA DE AVALIAÇÃO**

Nome: ALMEIDA, Alexandre Barreto

Título: Sistema biológico de aumento da taxa de prenhez. Embriões partenogênicos podem ajudar o reconhecimento materno da gestação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

**“ Erguei-vos, Senhor, em vossa potência !  
Cantaremos e celebraremos o vosso poder ”**

*Salmo 20*

**DEDICO** este trabalho ao meu

amável filho Joãozinho!!



## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela benção de acompanhar-me nesta caminhada tão importante. Graças e louvores sejam dados sempre e em todo lugar.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos especialmente aos professores Dr. ED HOFFMANN MADUREIRA e Dr. FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES pelo incentivo à produção científica, pelo conhecimento transmitido nesses anos de convívio e sobre tudo,, pela amizade construída nesses anos.

Aos amigos e professores do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP pelo harmonioso convívio e agradável convivência.

Aos professores Dr. JOSÉ ANTONIO VISINTIN e Dr. RENATO CAMPANARUT BARNABE pelos exemplos de vida que transmitiram para mim desde o mestrado e pela contribuição que estes profissionais fizeram ao nosso departamento.

Aos profs Dr. MÁRIO BINELLI, Dra. CLÁUDIA LIMA LEAL e Dr. RUBENS PAES DE ARRUDA e Dra. ANNELIESE TRALDI pelas constantes trocas de idéias e ajudas recíprocas.

À Fazenda São João do Araquá, pela colaboração na execução deste projeto e pelo companheirismo da Dra. ISABEL A.S. BORDIN e Dr. JOSÉ ORLANDO BORDIN.

Pela equipe de campo da Araquá, Sr. JAIR ALMEIDA, ALEX, RODRIGO, LEANDRO, GUSTAVO e SANDRO.

À empresa INVITROBRASIL, em especial à CHRISTINA FERREIRA pela especial participação neste projeto.

Aos amigos RICARDO DEMÉTRIO e ÉDER BRANDEBURGO.

Ao Moisés e Estela Kobashigawa pela grande ajuda na análise estatística realizada neste projeto.

Aos técnicos do VRA e LMMD : MÁRCIO, ISABEL, GIOVANA, NILTON E ROBERTA

Aos amigos do VRA: especialmente ao ZÉ RODRIGO, PÉRCIO, CARLINHA, VANESSA MARQUES, FERNANDO PARDO, FERNANDINHO, CLAUDINHA, JULIANA, SIMPRÃO, FELIPE PIRA, SILAS, ANDRÉ, FERNANDO.

Aos amigos do LMMD: MOÍSES, FELIPE BEERITA, PAULÃO, TIAGO, PEDRINHO, MARCOS, PERECIN, FERNANDO, LIGIA, SÍLVIA, MARTINI, ADRIANA, WERUSKA, GIOVANA, PATRÍCIA e CRISTINA.

Aos meus pais, minha irmã e à Paula pelo amor dedicado e compreensão na produção deste doutorado.

À FAPESP pelo apoio financeiro (04/03965-8).

## RESUMO

ALMEIDA, A. B. **Sistema biológico de aumento da taxa de prenhez. Embriões partenogênicos podem ajudar o reconhecimento materno da gestação.** [Biological system to increase pregnancy rate. Parthenogenetic embryos can help the maternal recognition of the gestation]. 2008. 88 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar e comparar a taxa de prenhez de receptoras bovinas nulíparas, após transferência de embriões fecundados *in vitro* ou *in vivo*, associados ou não a um embrião partenogênico. Um total de 239 novilhas foram utilizadas, e as médias das taxas de prenhez aos 30 (TP30d) e 60 dias (TP 60d), foram comparadas em arranjo fatorial 8x2 entre G1 e G2 (fecundados *in vitro*), e em análise fatorial 3x2, entre G3 e G4 (fecundados *in vivo*). O delineamento utilizado foi: G1) transferência de 1 embrião fecundado *in vitro* (n=86); G2) transferência de 1 embrião partenogênico associado a 1 embrião fecundado *in vitro* (n=81); G3) transferência de 1 embrião fecundado *in vivo* (n=36) e G4) transferência de 1 embrião partenogênico associado a 1 embrião fecundado *in vivo* (n=36). A taxa de prenhez aos 30 dias para o G1 foi de 31,3% (27/86) e do G2 de 37,0% (30/81); P= 0,28. Para o G3, de 55,5% (20/36) e G4, de 75,0% (27/36); P=0,09. Não houve diferença (P=0,92) para taxa de prenhez aos 60 dias para o G1 em relação ao G2, com taxas de 24,6% (22/86) e 28,2% (23/81); respectivamente. Também não houve diferença (P=0,08) aos 60 dias para o grupo G3 em relação ao G4, com taxas de 44,4 % (16/36) e 61,1% (22/36), respectivamente. As perdas embrionárias no período foram de 14,81% para o G1, 33,34% para o G2, 25,00% para o G3 e 18,52% para o G4. As médias de peso ao nascimento dos animais pertencentes ao G1 e G2, foram de 26,3 Kg ( $\pm 1,2$ ; n=6) e 28,8 Kg ( $\pm 2,1$ ; n=7) respectivamente. As médias dos dias de gestação das receptoras dos grupos G1 e G2 foram de 290 dias ( $\pm 2,1$ ) e 292,8 dias ( $\pm 1,1$ ) respectivamente. Para avaliar o embrião partenogênico em relação aos embriões fecundados *in vitro* após 9 dias de cultivo embrionário, foi determinado os resultados para as seguintes variáveis dependentes: taxa de clivagem, taxa de blastocisto, taxa de blastocisto eclodido, número de núcleos e frequência do RNAm do IFN- $\tau$  em 6 sessões de produção embrionária. Os resultados foram analisados em fatorial 6x2. Foi observada

diferença ( $P < 0.05$ ) nas taxas de clivagem, blastocisto e eclosão entre os tratamentos, houve diferença entre número de núcleos, 231 para os fecundados e 156 para os partenogénéticos ( $P = 0.001$ ), e para a expressão do gene do IFN- $\tau$ , os embriões partenogénéticos expressaram mais o gene do IFN em relação aos fecundados ( $P = 0.001$ ). Finalmente, *Western blots* foram realizados para identificar a proteína do IFN- $\tau$  bovino em embriões fecundados e partenogénéticos após 12 dias de cultivo. Bandas correspondente ao IFN- $\tau$  foram encontradas nos meios de cultivo onde permaneceram os embriões fecundados e partenogénéticos com peso molecular médio de 24 kDa. Não se detectou uma banda específica ao IFN- $\tau$  nos extratos embrionários. Tendo em vista o apresentado, conclui-se que apesar dos embriões partenogénéticos expressarem o gene e secretarem a proteína do IFN- $\tau$ , a transferência de um embrião partenogénético, associado a embriões fecundados *in vitro* ou *in vivo*, não favoreceu ( $P < 0.05$ ) ao aumento da taxa de prenhez, mas não prejudicou o desenvolvimento da gestação a termo em bovinos.

Palavras-chave: Partenogénéticos. Interferon tau. Reconhecimento materno. Taxa de prenhez. Bovinos.

## ABSTRACT

ALMEIDA, A. B. **Biological system to increase pregnancy rate. Parthenogenetic embryos can help the maternal recognition of the gestation.** [Sistema biológico de aumento da taxa de prenhez. Embriões partenogenéticos podem ajudar o reconhecimento materno da gestação]. 2008. 88 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The aim of this work was to evaluate the bovine pregnancies rate of *in vitro* and *in vivo* produced embryos associated or not to a parthenogenetic embryo in heifers. Two hundred thirty nine recipients were used. The average of pregnancies rate were compared between G1 and G2 (*in vitro*) and between G3 and G4. (*in vivo*). The groups were: G1) 1 *in vitro* fertilized embryo (n=86); G2) 1 parthenogenetic embryo associated with 1 *in vitro* fertilized embryo (n=81); G3) 1 *in vivo* fertilized embryo (n=36) and G4) 1 parthenogenetic embryo associated with 1 *in vivo* fertilized embryo (n=36). Pregnancy rate at day 30 for G1 was 31.3% (27/86) similar to G2 37.0% (30/81); P=0.28. Group 3 rate was 55.5% (20/36) and also similar to G4, 75.0% (27/36); P=0.09. There was no difference (P=0.92) to pregnancy rate at day 60 for G1 compared with G2. The G1 and G2 rates were 26.74% (23/86) and G2 24.69% (20/81) respectively. Also, there were no difference (P=0.08) between G3 and G4. The G3 and G4 rates were 44.4 % (16/36) and 61.1% (22/36) respectively. The embryonic loss in this period was 14.81% for G1, 33.34% for G2, 25.00% for G3 and 18.52% for G4. The calf average weight of these animals from G1 and G2 were respectively 26.3Kg ( $\pm 1.2$ ; n=6) and 28.8 Kg ( $\pm 2.1$ ; n=7). The average pregnancy length of the recipients from G1 and G2 were respectively 290 days ( $\pm 2.1$ ) and 292.8 days ( $\pm 1.1$ ). To evaluate the parthenogenetic embryo quality, the cleavage rate, blastocysts rate, hatching rate, the number of nuclei, immunocytochemistry for IFN- $\tau$ , and the mRNA frequency of IFN- $\tau$  was determined in 9 days harvesting parthenogenetic and *in vitro* fertilized embryos. Difference (P<0.05) was observed in cleavage, blastocysts and hatching rates, nuclei counting between fertilized embryo (n=231) compared to the parthenogenetic embryo (n=156) and the mRNA relative quantification of the IFN- $\tau$  gene showed that fertilized embryos have lower expression compared to parthenogenetic embryo (P<0.01). Finally, the western blots analysis for IFN- $\tau$  protein was performed in 12 days harvested embryos. Bands for

IFN- $\tau$  were found in culture medium from fertilized and parthenogenetic embryos with average molecular weight of 24 kDa. The IFN- $\tau$  specific protein was not found in the embryonic extracts. In view of the presented results we conclude that despite the production and secretion of IFN- $\tau$  the association of the parthenogenetic embryo with the fertilized embryo do not favored the pregnancy establishment, however do not interfered in the development of bovine pregnancy to term.

Key word: Parthenogenetic. Interferon tau. Maternal recognition. Pregnancy rates. Bovine.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüência dos <i>primers</i> e sondas utilizadas no experimento....	37
Tabela 2 - Taxas de clivagem, blastocisto e blastocisto eclodido de embriões bovinos submetidos a 6 sessões de produção embrionária, segundo tratamento <i>in vitro</i> , fecundação (FIV) ou ativação partenogenética.....	46
Tabela 3 - Número de núcleos e expressão relativa do gene do IFN- $\tau$ de embriões bovinos submetidos a 6 sessões de produção embrionária, segundo tratamento <i>in vitro</i> (fertilização ou ativação partenogenética).....	48
Tabela 4 - Número de núcleos dos embriões fecundados e partenogenéticos no estágio de blastocisto após 7 dias de cultivo.....	53
Tabela 5 - Taxas de prenhez (TP 30d e TP 60d) em receptoras bovinas nulíparas, segundo sessão de PIV e tratamento.....	55
Tabela 6 - Taxas de prenhez (TP 30d e TP 60d) em receptoras bovinas nulíparas, segundo sessão de TE e tratamento.....	57
Tabela 7 - Taxa de prenhez aos 30 (TP 30 D) e 60 dias (TP 60 D) para o G1 e G2 por sessão de Transferência de embriões (TE).....	59
Tabela 8 - Raça, sexo, peso e dias de gestação dos animais correspondentes ao grupo dos embriões fecundados <i>in vitro</i> associados a partenogenéticos(G2).....	59

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Exemplo de análise da curva de eficiência para cada poço individual através do software “LinRegPCR”, onde as linhas azuis do gráfico superior indicam intervalo analisado da curva de amplificação em sua fase exponencial, e o gráfico inferior mostra as eficiências calculadas..... 38
- Figura 2 - Exemplo do padrão racial das receptoras utilizadas na Fazenda Araquá, Charqueada (SP)..... 43
- Figura 3 - Efeito do tratamento para taxa de clivagem (F: fecundação; A: ativação partenogenética) durante 6 sessões de produção embrionária. a,b - colunas com letras diferentes sobrescritas diferem tratamento dentro da sessão; 1,2,3 - colunas com números diferentes sobrescritos diferem sessão dentro de tratamento..... 47
- Figura 4 - Curva padrão correspondente aos genes GAPDH (a) IFN- $\tau$  (b) em diferentes diluições. a)  $R^2=0,9831$ ; b)  $R^2=0,9896$ . 49
- Figura 5 - Cultivo embrionário aos 9 dias. O diâmetro do embrião (e) foi estimado em comparação com o do oócito (setas) colocado no momento da foto. A) Fecundação *in vitro*; B) Ativação partenogenética. Barras representam 100  $\mu\text{m}$ ..... 50
- Figura 6 - Cultivo embrionário aos 12 dias. O diâmetro do embrião (e) foi estimado em comparação com o do oócito (setas) colocado no momento da foto. A) Fecundação *in vitro*; B) Ativação partenogenética. Barras representam 100  $\mu\text{m}$ . Dentro do círculo um blastocisto de 620  $\mu\text{m}$ ..... 50
- Figura 7 - *Western blotting* para detecção da proteína do IFN- $\tau$  em meios de cultivo onde permaneceram seis embriões do D9 ao D12. A) Controle negativo; B) Quinze embriões FIV D12; C) Quinze embriões partenogenéticos D12; D) Meio de cultivo dos embriões FIV; E) Meio de cultivo dos embriões partenogenéticos; F) Meio de cultivo com 10% SFB e G) rIFN- $\tau$ ..... 51
- Figura 8. Blastocistos eclodidos após 9 dias de cultivo. A, B e C: Fecundados; D, E e F: partenogenéticos. As letras correspondem aos indivíduos. 1) coloração em Hoesch (azul) para contagem do número de núcleos. 2) Imunocitoquímica (vermelho) para detecção de células produtoras de IFN- $\tau$ ..... 52
- Figura 9 - Blastocistos após 7 dias de cultivo: a) fecundados



	b) partenogénéticos.....	53
Figura 10 -	Amplificação relativa do gene do IFN- $\tau$ em relação ao GAPDH de embrião partenogénético aos 21 dias. A) IFN- $\tau$ ; B) GAPDH.....	54
Figura 11 -	Figura a: Bezerros produzidos <i>in vitro</i> originários do G1 e G2 (da esquerda para direita). Figura b: Doadora dos oócitos com os bezerros. Figura c: Receptora do G1 com bezerro; Figura d: Receptora do G2 com o bezerro.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-DMAP	6-dimetilaminopurina
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
BE	Benzoato de estradiol
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
cDNA	DNA complementar
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CL	Corpo lúteo
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX-2	Cicloxigenase
CT	Ciclo do “threshold”
D	Dias
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTPs	Trifosfato de desoxinucleosídeos
DPBS	Dulbecco's solução salina com tampão fosfato
eCG	Gonadotrofina coriônica equína
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FSH	Hormônio folículo estimulante
G	Gauge
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GVBD	Ruptura da vesícula germinativa
HPLC	High performance liquid chromatography
IFN- $\alpha$	Inteferon gama
IFN- $\tau$	Interferon tau
bIFN- $\tau$	Interferon tau bovino
oIFN- $\tau$	Interferon tau ovino
rbIFN- $\tau$	Interferon tau recombinante
IgG	Imunoglobulina G
IM	Intra muscular

kDa	Quilo Daltons
Kg	Quilogramas
LH	Hormônio luteinizante
MII	Metáfase II
MAP	Proteína ativada por mitógeno
Mg <sup>2+</sup>	Magnésio
mg	Miligramas
ml	Mililitros
MHz	Mega Hertz
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MOET	Múltipla ovulação e transferência de embrião
mmHg	Milímetros de mercúrio
MPF	Fator promotor de metáfase
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
ng/ml	Nanogramas por mililitros
parteno	partenogenético
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
PHE	Penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PI	Prófase I
PBS	Solução salina com tampão fosfato
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PVA	Álcool polivinílico
PVDF	Difluorido de polivinilideno
PVP	Polivinil pirrolona
RNA	Ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa - PCR
SAS	“Statistical Analysis System”
SFB	Soro fetal bovino
SOF	Fluido sintético de oviduto

TALP	“Tyrode’s Albumin Lactate and Pyruvate”
TCM199	“Tissue Culture Medium”
TE	Transferência de embriões
TETF	Transferência de embriões em tempo fixo
TP 30d	Taxa de prenhez aos 30 dias
TP 60d	Taxa de prenhez aos 60 dias
UI	Unidade internacional
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	micromolar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>3 HIPÓTESE .....</b>	<b>25</b>
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>26</b>
4.1 MATURAÇÃO E CULTIVO EMBRIONÁRIO.....	26
4.2 ATIVAÇÃO ARTIFICIAL OU PARTENOGENÉTICA.....	27
4.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	28
4.4 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO.....	28
4.4.1 Interferon- $\tau$ .....	28
4.4.2 Mecanismos de ação do IFN- $\tau$ .....	29
4.4.3 Estimativas da expressão do IFN- $\tau$ no embrião.....	29
4.5 TAXA DE PRENHEZ DE EMBRIÕES <i>IN VIVO</i> X <i>IN VITRO</i> .....	30
4.5.1 Progesterona .....	30
4.5.2 Estratégias para aumento da taxa de prenhez.....	31
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
5.1 LOCAIS DAS ATIVIDADES.....	32
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
5.3 PRIMEIRA ETAPA.....	33
5.3.1 Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	33
5.3.2 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	34
5.3.3 Ativação oocitária e produção de embriões partenogenéticos.....	34
5.3.4 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	35
5.3.5 Estimativa de tamanho dos embriões D9 e D12.....	35
5.3.6 Avaliação e contagem do número de núcleos dos embriões fecundados e partenogenéticos após 9 dias de cultivo.....	35
5.3.7 Transcrição reversa.....	36
5.3.8 Avaliação do gene do IFN- $\tau$ pela PCR em Tempo Real de blastocistos eclodidos FIV e Partenogenéticos .....	36
5.3.9 PCR em tempo real.....	37

5.3.10 Análise estatística da PIV, contagem do número de núcleos e expressão relativa do gene do IFN- $\tau$ de embriões FIV e partenogénéticos.....	38
5.3.11 Imunocitoquímica para observação da presença do IFN- $\tau$ em embriões eclodidos.....	39
5.3.12 Eletroforese unidimensional e <i>Western blotting</i> .....	40
5.4 SEGUNDA E TERCEIRA ETAPAS.....	41
5.4.1 Sincronização do ciclo estral das receptoras de embriões.....	41
5.4.2 Aspiração folicular <i>in vivo</i> guiada por ultra-sonografia.....	41
5.4.3 Superovulação e colheita de embriões fecundados <i>in vivo</i> .....	42
5.4.4 Transferência dos embriões (TE).....	42
5.4.5 Diagnóstico de prenhez e avaliação das perdas embrionárias.....	43
5.4.6 Análise estatística das taxas de prenhez.....	43
5.4.7 Colheita de concepto partenogénético aos 21 dias de gestação.....	44
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
6.1 PRIMEIRA ETAPA.....	45
6.1.1 Taxas de clivagem, taxas de blastocisto, taxas de blastocisto eclodido, contagem de número de núcleos e expressão relativa do gene do IFN- $\tau$ de embriões fecundados <i>in vitro</i> e partenogénéticos	45
6.1.2 Estimativa do diâmetro de embriões fecundados e partenogénéticos.....	49
6.1.3 Imunocitoquímica.....	51
6.1.4 Identificação do IFN- $\tau$ pela técnica do <i>Western blotting</i> .....	51
6.1.5 Número de núcleos dos embriões fecundados e partenogénéticos no 7º dia de cultivo.....	53
6.1.6 Expressão relativa do gene do IFN- $\tau$ de embrião partenogénético colhido aos 21 dias de gestação.....	54
6.2 SEGUNDA ETAPA.....	54
6.2.1 Taxas de prenhez aos 30 dias (TP 30d) e aos 60 dias (TP 60d) para embriões fertilizados <i>in vitro</i> , associados ou não a um embrião partenogénético.....	54
6.3 TERCEIRA ETAPA.....	56
6.3.1 Taxas de prenhez aos 30 dias (TP 30d) e aos 60 dias (TP 60d)	

para embriões fertilizados <i>in vivo</i> , associados ou não a um embrião partenogenético.....	56
6.4 NASCIMENTOS DE BEZERROS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> .....	58
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	<b>66</b>
<b>9 ANEXOS</b> .....	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em função dos avanços tecnológicos alcançados, os pecuaristas passaram a aplicar a tecnologia de Fecundação *in vitro* (FIV) para produção de embriões bovinos. A aplicação da FIV com boa taxa de recuperação de oócitos e taxa bastante razoável de produção de blastocistos demandam um grande número de receptoras aptas à inovulação.

Embora bem preparadas, receptoras inovuladas com embriões produzidos *in vitro* (PIV) produzem taxas de gestação mais baixas comparados com os embriões produzidos por Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOET).

Atualmente, laboratórios comerciais aplicando diversos processos de produção *in vitro* de embriões bovinos têm obtido taxas de blastocistos viáveis de 30-40%. As condições de cultivo *in vitro* (CIV) têm sido determinantes para não afetar o potencial de desenvolvimento embrionário (SIRARD e BLONDIN, 1996).

Os embriões produzidos *in vitro* diferem dos *in vivo* em vários aspectos (MASSIP et al., 1995; WRIGHT e ELLINGTON, 1995), tais como citoplasma mais escuro e menor densidade (POLLARD e LEIBO, 1994), maior quantidade de triglicerídeos e menos lipídeos (EL RAZEC et al., 2000), aumento do tamanho dos blastômeros e menor número de células da massa celular interna (VAN SOOM et al., 1992), zona pelúcida mais frágil (DUBY et al., 1997), diferenças nas junções intercelulares (BONI et al., 1999) e maior incidência de anomalias cromossômicas (VIUFF et al., 1999; SLIMANE et al., 2000). Todas estas diferenças contribuem para a baixa taxa de sobrevivência embrionária e, conseqüentemente para uma baixa taxa de concepção dos embriões *in vitro*.

Em bovinos, até aproximadamente o 42º dia de prenhez, o desenvolvimento da fase embrionária compreende processos como ativação do genoma do embrião, compactação, formação de blastocele, alongação do trofoblasto, secreção de interferon-tau (IFN- $\tau$ ) e início da implantação.

O IFN- $\tau$  é uma proteína que é secretada pelo trofocitodermia do concepto, responsável pela sinalização da prenhez, através da prevenção da luteólise (EALY et al., 1998; BAZER et al., 1997 e TATCHER et al., 1997). O IFN- $\tau$  é secretado pelo trofocitodermia quando o embrião atinge o estágio de blastocisto e nesse período o



RNA<sub>m</sub> pode ser extraído e a proteína detectada em meios de cultura (KUBISCH et al., 2001).

A primeira resposta do endométrio ao IFN- $\tau$  é a *down regulation*, nas concentrações de receptores para ocitocina e estrógeno (SPENCER et al., 1995) e inibição da COX-2 (BINELLI et al, 2000).

Falhas do conceito em produzir a quantidade adequada ou endométrio em responder ao IFN- $\tau$  podem acarretar em perdas embrionárias (ROBERTS, 1991). A transcrição do gene IFN- $\tau$  bem como a secreção da proteína pode ser afetada por fatores genéticos ou fatores ambientais (JOHNSON, 2006).

Foi confirmado por microscopia eletrônica e reação em cadeia da polimerase, que embriões partenogênicos produzem mais IFN- $\tau$  que embriões produzidos *in vitro* (KUBISCH et al., 2003). Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito na prenhez de bovinos com a transferência de embriões partenogênicos juntamente com embriões produzidos *in vitro* ou com embriões *in vivo*. Este estudo foi desenvolvido com a hipótese de que embriões partenogênicos favoreçam o aumento da produção de IFN- $\tau$  e, conseqüentemente, levem a uma melhoria na sinalização da sobrevivência embrionária.

## 2 OBJETIVOS

- Determinar e comparar a frequência do RNA mensageiro, do gene do IFN- $\tau$ , em embriões fecundados *in vitro* e partenogênicos, no 9º dia de cultivo embrionário.
- Avaliar e comparar a taxa de prenhez de receptoras bovinas nulíparas, após transferência de embriões fecundados *in vitro* ou *in vivo*, associados ou não a um embrião partenogênico.

### 3 HIPÓTESES

- Embriões partenogénéticos, à semelhança dos fecundados *in vitro*, possuem a capacidade de expressar o gene do IFN- $\tau$  no 9º dia de cultivo embrionário.
- Embrião partenogénético produzido *in vitro*, transferido junto com um embrião fecundado produz um aumento na taxa de prenhez, durante o período do reconhecimento materno da gestação em bovinos, provavelmente mediante aumento da produção de IFN- $\tau$ .

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 MATURAÇÃO E CULTIVO EMBRIONÁRIO

A maturação oocitária é o processo da retomada da meiose da primeira divisão meiótica (Prófase I - PI) até a metáfase da segunda divisão (Metáfase II – MII) sendo caracterizada por ruptura da vesícula germinativa (GVBD), desaparecimento do nucléolo, condensação dos cromossomos, extrusão do primeiro corpúsculo polar, formação do segundo fuso meiótico e expansão das células do *cumulus* (GORDON, 1994, HE et al., 1997).

*In vivo* este processo inicia-se com o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) e *in vitro* como os oócitos aspirados são bastante heterogêneos devido ao tamanho e estágio do folículo dependendo da fase do ciclo estral em que se encontra a doadora, os oócitos devem ser submetidos à maturação *in vitro* (MIV) com meios suplementados de hormônios, fontes protéicas e energéticas para que alcancem o estágio de MII (AVELINO, 2000; FARIN et al., 2001).

A maturação divide-se em nuclear e citoplasmática, a primeira é mais facilmente atingida, visto que ocorre espontaneamente após a liberação do oócito do interior do folículo (RICHARD e SIRARD, 1996), já a maturação citoplasmática envolve redistribuição das organelas intracelulares como a migração das mitocôndrias para localização perinuclear e dos grânulos corticais para a periferia da célula (GORDON, 1994; HE et al., 1997).

Os oócitos maturados são mantidos no estágio de MII devido à presença do fator promotor de Metáfase (MPF) e da proteína ativada por mitógeno (MAP) promovendo a ruptura da membrana nuclear e manutenção da cromatina condensada (MEIJER e PONDAVEN, 1988; VERLHAC et al., 1994; YANG et al., 1994; HOMA, 1995) e para que o oócito em MII retome seu desenvolvimento, é necessário que alterações morfológicas e bioquímicas ocorram na presença do espermatozóide (fecundação) ou por estímulo artificial, conhecido como ativação partenogenética (KÜPKER et al., 1998).

A fecundação e a ativação partenogenética promovem alterações na concentração de cálcio intracelular e diminuição da atividade do MPF e da MAP, culmina com exocitose dos grânulos corticais, endurecimento da zona pelúcida,

formação dos pronúcleos e início das mitoses (WHITE e YUE, 1996; KÜPKER et al., 1998).

Em bovinos, cerca de 60-70% dos oócitos maturados *in vitro* não progridem a blastocisto, e o estágio em que os embriões param de se desenvolver é variável, mas ocorre, geralmente, no momento da transição materno-zigótica, ou seja, no quarto ciclo celular ou estágio de oito células (MEIRELLES et al., 2004).

O bloqueio do desenvolvimento pode ser causado por vários fatores, tais como, condições inadequadas de cultivo, anormalidades cromossômicas, “stress” oxidativo (BETTS e KING, 2001), choque térmico (RIVERA et al., 2004), presença de glicose e fosfato inorgânico no meio de cultivo (SCOTT e WHITTINGHAM, 2002), transcritos e proteínas do ciclo celular, como p27 (CIVICO et al., 2002), e proteínas da cascata de apoptose, como p57 e p66 (FAVETTA et al., 2004).

## 4.2 ATIVAÇÃO ARTIFICIAL OU PARTENOGENÉTICA

Vários tratamentos artificiais de ativação já foram descritos e atuam por mecanismos diversos, alguns promovem o aumento de cálcio intracelular, como estrôncio e a ionomicina (CUTHBERTSON et al., 1981), enquanto outros inibem a fosforilação protéica, como 6-dimetilaminopurina (6-DMAP; SUSKO-PARRISH et al., 1994), porém nenhum tratamento artificial é capaz de mimetizar todos os eventos desencadeados pela fecundação (NAKADA e MIZUNO, 1998).

O estrôncio se comporta de maneira mais fisiológica, promovendo pulsos múltiplos de cálcio (BOS MIKICH et al., 1997), enquanto o 6-DMAP pode comprometer o desenvolvimento embrionário (ALBERIO et al., 2001).

Nos embriões partenogenéticos não há separação das cromátides e o pronúcleo é formado diretamente a partir da descondensação dos cromossomos em MII, acarretando a diploidia (MÉO, 2002), entretanto apresentam falhas na expressão de alguns genes, principalmente dos genes “imprinted” devido à presença exclusiva de material genético de origem materna (URANGA e ARECHAGA, 1997; VAN DE VELDE et al., 1999).

Embriões partenogenéticos produzidos pelo tratamento com ionomicina e 6-DMAP apresentaram desenvolvimento até o 35º dia da gestação, mas a falta de

cromossomos paternos impossibilita a formação da placenta, momento em que ocorre a morte embrionária dos partenogénéticos (MÉO, 2005).

### **4.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**

Em bovinos, o desenvolvimento da fase embrionária compreende processos complexos como ativação do genoma do embrião, compactação, formação de blastocelo, alongação do trofoblasto, secreção de IFN- $\tau$  para manutenção do corpo lúteo, diferenciação dos tecidos da placenta e implantação. Até aproximadamente o 42º dia de vida do embrião, todos estes processos podem não ocorrer devido alguma falha intrínseca no embrião (HANSEN, 2002).

### **4.4 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO**

#### **4.4.1 Interferon- $\tau$**

Interferons produzidos pelos conceptos de bovinos apresentavam atividades peculiares aos IFN tipo I e foram nomeados de IFN- $\tau$  por sua origem trofoblástica, sendo produzido em quantidades suficientes para a manutenção do corpo lúteo (CL) entre o 15º e 17º dia da gestação, (THATCHER, 1989).

Essa sinalização é potencializada à medida que o embrião aumenta de tamanho, e quantidades inadequadas de IFN- $\tau$  para bloquear a produção de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) no útero, levam a interrupção da gestação (LEUNG, 2000).

O IFN- $\tau$  atua na inibição da proliferação celular e como todos IFN tipo I, o IFN- $\tau$  também se liga a receptores dos quais ativam fatores de transcrição (ALEXENKO et al., 1997; BINELLI et al., 1998) induzindo à expressão de diversos genes (OTT et al., 1998).

Múltiplos genes que codificam IFN- $\tau$  são transcritos durante o período inicial da gestação, com 12 isoformas de IFN- $\tau$  já conhecidas (ALEXENKO et al., 2000)

produzindo proteínas com atividades biológicas diferentes (EALY et al., 1998; EALY et al., 2001; WINKELMAN et al., 1999).

#### **4.4.2 Mecanismos de ação do IFN- $\tau$**

O mecanismo geral pelo qual o IFN- $\tau$  inibe a regressão do CL é a supressão da liberação pulsátil de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  endometrial. O IFN- $\tau$  atua inibindo a síntese de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (BAZER et al., 1991 e BINELLI et al., 2000).

O IFN- $\tau$  atenua a secreção de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  em células epiteliais, consideradas fonte primária desse tipo de prostaglandina, através da regulação negativa de RNAm para Cicloxigenase 2 (COX-2), enquanto nas células estromais, o IFN- $\tau$  notadamente estimula a expressão de COX-2 (XIAO et al., 1998).

#### **4.4.3 Estimativas da expressão do IFN- $\tau$ no embrião**

A expressão de IFN- $\tau$  pode ser mensurada utilizando-se diversos métodos capazes de identificar esta proteína em meios de cultura ou fluidos biológicos, ou mesmo a expressão de seu RNAm em tecidos e células.

A transcrição do RNAm para a diferenciação inicial e funcional das células do trofoblasto é importante para que ocorra o diálogo entre as células do trofocotodema do concepto e as células do endométrio para a manutenção do CL e a sobrevivência embrionária. O sistema de cultura e a fonte de suplementação protéica afetam a freqüência da expressão do gene do IFN- $\tau$  (WRENZYCKI et al., 1999).

Métodos como o teste de imunodifusão baseia-se na reação de precipitação do antígeno e anticorpo em meios líquidos, e foi utilizada para identificar IFN- $\tau$  bovino e ovino (HELMER et al., 1987).

Técnicas como a cromatografia líquida de alta performance (HPLC – high performance liquid chromatography) também foram utilizadas para purificar bIFN- $\tau$  recombinante (rbIFN- $\tau$ ) e determinar a produção dessa proteína por cepas da levedura *Pichia pastoris* (SINHA et al., 2003).

Um radioimunoensaio para detecção do bIFN- $\tau$  foi desenvolvido (TAKAHASHI et al., 2005; NAGAYA et al., 2004 e EALY et al., 1998). Outros utilizaram a técnica

de Western blotting para detecção do bIFN- $\tau$  e oIFN- $\tau$  (GUILLOMOT et al., 1998).

Vários estudos relacionados a aspectos do reconhecimento materno da gestação foram desenvolvidos utilizando ensaios de atividade antiviral como indicativo da secreção de IFN- $\tau$  (Rubinstein et al., 1981). Utilizando esse método, a secreção de IFN- $\tau$  produzida por embriões obtidos *in vivo* ou produzidos *in vitro* foi comparada (STOJKOVIC et al., 1999).

Embriões que desenvolveram mais rapidamente até o estágio de blastocisto produziram maiores quantidades de IFN- $\tau$  em relação ao grupo que demorou mais a atingir o mesmo estágio (KUBISCH et al., 2003, WRENZYCKI et al., 1999).

Porém, em estudo com três isoformas recombinantes de bIFN- $\tau$  não foi observada relação entre atividade antiviral relatada e a capacidade em modular a síntese de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  observada em células epiteliais e estromais endometriais (PARENT et al., 2003).

Vários trabalhos têm mostrado os fatores que interferem a produção de IFN- $\tau$  em blastocistos bovinos (KUBISCH et al., 1998; LARSON e KUBISCH, 1999; WRENZYCKI et al., 1999).

## **4.5 TAXA DE PREENHEZ DE EMBRIÕES *IN VIVO* X *IN VITRO***

### **4.5.1 Progesterona**

Fêmeas que falham na concepção apresentam menores concentrações de progesterona em relação àquelas que se tornam gestantes (LUKASZEWSKA e HANSEL, 1980; LAMMING et al., 1989) e a baixa concentração de progesterona na fase luteal de novilhas foi correlacionada com embriões considerados subdesenvolvidos para o 16<sup>o</sup> dia de gestação (WATHES et al., 1998).



#### 4.5.2 Estratégias para aumento da taxa de prenhez

Estudos voltados à prevenção da mortalidade embrionária com a utilização de hormônios exógenos vêm sendo cada vez mais utilizados como estratégias anti-luteolíticas e têm apresentado resultados variáveis (PETERS, 1996).

Em 2001, a equipe de Binelli citaram estratégias para impedir o mecanismo luteolítico desencadeado pela liberação de prostaglandina F<sub>2α</sub>, como o aumento do tamanho e da taxa de crescimento do corpo lúteo, o incremento das concentrações plasmáticas de progesterona durante o diestro e tal como a redução da ação do folículo dominante durante os 15 e 17 do ciclo estral.

Implantes auriculares de norgestomet foram utilizados no dia da TE de embriões produzidos *in vitro*, e as taxas de prenhez foi de 51,9% para o grupo que recebeu implante e de 49,6% para o grupo não tratado, e não observaram diferenças nas concentrações plasmáticas de progesterona no dia precedente a inovulação entre as receptoras que engravidaram daquelas que retomaram ao cio (SMITH et al., 1996).

A utilização de 500 UI da eCG no 5º dia após a colocação de implantes contendo progesterona tem por finalidade aumentar o efeito do diâmetro do corpo lúteo no ovário ipsilateral à transferência de embriões conforme estudos realizados na Holanda (GARCIA e SALAHEDDINE, 2000), nos Estados Unidos (SPELL et al., 2001) e no Brasil (BARUSELLI et al., 2000; MARQUES, 2001)

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 LOCAIS DAS ATIVIDADES

As atividades laboratoriais foram desenvolvidas 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 (FZEA) e em colaboração com Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ).

As atividades a campo contaram com a participação do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia da Reprodução (LFER), do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (FMVZ), junto com o laboratório InVitro Brasil, Mogi Mirim (SP) e em colaboração com a Fazenda São João do Araquá, Charqueada (SP).

### 5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho foi dividido em três etapas. A **primeira**, composta exclusivamente pelas atividades laboratoriais, responsável pela produção *in vitro* de embriões fecundados e partenogênicos, quantificação relativa do RNAm do gene do IFN- $\tau$ , *Western blotting* para detecção da proteína do IFN- $\tau$  e imunocitoquímica, para observação da presença do IFN- $\tau$  em embriões eclodidos.

Embriões FIV e partenogênicos foram comparados para as seguintes variáveis: taxa de clivagem, taxa de blastocisto, taxa de blastocisto expandido, número de núcleos e expressão relativa do gene do IFN- $\tau$ .

Foram realizadas 6 sessões de produção *in vitro* (PIV), nas quais foram utilizados, por sessão, 2 tratamentos: fertilização ou ativação partenogênica.

Os oócitos foram distribuídos, aleatoriamente, para receber um dos tratamentos, FIV ou ativação partenogênica, num delineamento prospectivo

inteiramente casualizado, dentro de cada sessão. Entretanto, para as análises estatísticas considerou-se um arranjo fatorial do tipo 6 x 2 (6 sessões de PIV x 2 tratamentos).

Na **segunda etapa**, o experimento apresentou um delineamento inteiramente casualizado, com 2 grupos distintos (G1 e G2): G1) transferência de 1 embrião fecundado *in vitro* (n=86); G2) transferência de 1 embrião partenogênético, associado a 1 embrião fecundado *in vitro* (n=81), organizados em esquema fatorial 8x2 (8 sessões de PIV x 2 tratamentos).

A **terceira etapa** foi composta por mais dois grupos (G3 e G4). G3) transferência de 1 embrião fecundado *in vivo* (n=36) e G4) transferência de 1 embrião partenogênético associado a 1 embrião fecundado *in vivo* (n=36) organizados em esquema fatorial 3x2 (3 sessões de TE x 2 tratamentos).

### 5.3 PRIMEIRA ETAPA

A produção *in vitro* (PIV) de embriões consistiu na aquisição de oócitos viáveis para maturação, fecundação com espermatozoides capacitados e o desenvolvimento do zigoto até o estágio de blastocisto.

#### 5.3.1 Maturação *in vitro* (MIV)

Os oócitos foram maturados em meio TCM199, com sais de Earles (Invitrogen™), glutamina e NaHCO<sub>3</sub>, suplementado com 10% de SFB, piruvato (22µg/mL), gentamicina (50µg/mL), 0,5 µg/mL de FSH, 50µg/mL de LH e 1,0 µg/ml de estradiol em microgotas de 90µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral e levados à incubadora, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, em ar, à 38,5°C, durante 22 a 24 horas.

### 5.3.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

Após o período de maturação, os oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro*, em microgotas de 100µl de meio TALP, suplementado com heparina (10µg/ml), piruvato (22µg/ml), gentamicina (50µg/ml), BSA sem ácidos graxos (6mg/ml) e solução de PHE (2µM de penicilamina, 1µM de hipotaurina e 0,25µM de epinefrina). As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho à 35°C, durante 30 segundos e seu conteúdo centrifugado em gradiente de Percoll (45 e 90%), para obtenção dos espermatozoides móveis, remoção do diluidor e do plasma seminal. Os oócitos foram transferidos para as microgotas (30 oócitos/gota), junto com os espermatozoides, à concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL, onde permaneceram sob incubação, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, em ar, à 38,5°C, durante 20 horas. A e ,

### 5.3.3 Ativação oocitária e produção de embriões partenogênicos

A produção do embrião partenogênico foi realizada após 24 horas de maturação *in vitro*, quando os oócitos foram desnudados e selecionados para o tratamento de ativação.

As células do *cumulus* dos oócitos foram removidas por incubação, em meio PBS, livre de cálcio, com 0,1% PVA e 0,2% de hialuronidase, à 38,5°C por 5 minutos, seguida por movimentos repetidos de pipetagem, durante 3 a 5 minutos.

Os oócitos de citoplasma homogêneo foram lavados 3 vezes, em meio TCM 199 Hapes (3 mg/ml de BSA) e incubados em gotas de 100µl, com 5 µM de ionomicina, em TALP livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (1mg/ml de BSA), por 5 minutos, em temperatura ambiente e, posteriormente, incubados em gotas de 100µl, com 2,0mM de 6-DMAP, em meio TALP-FIV, livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, por 3 horas, à 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o término do tratamento de ativação, os oócitos foram cultivados da mesma maneira que os embriões fecundados *in vitro*, como descrito a seguir.

#### **5.3.4 Cultivo *in vitro* (CIV)**

Após os processos de MIV, FIV ou ativação, os zigotos foram cultivados *in vitro* em meio CR<sub>2</sub>aa/SOF, suplementado com 2% de SFB e 5mg/ml de BSA, em presença de monocamada de células da granulosa, onde permaneceram sob incubação, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, em ar, à 38,5°C durante 7 a 12 dias.

#### **5.3.5 Estimativa de tamanho dos embriões D9 e D12**

Após 9 e 12 dias de cultivo embrionário, de cada sessão de PIV, foram realizadas fotos digitais, no microscópio estereoscópico, para comparação do tamanho dos embriões fecundados e partenogênicos, em relação aos oócitos existentes na placa. Foi considerado o tamanho médio de um oócito de 100 µm.

#### **5.3.6 Avaliação e contagem do número de núcleos dos embriões fecundados e partenogênicos após 9 dias de cultivo**

A qualidade dos embriões produzidos foi estimada mediante contagem de núcleos dos embriões fecundados e partenogênicos, nos estádios de blastocisto, após 9 dias de cultivo (n=72). Os embriões foram transferidos do meio de cultivo para uma solução contendo paraformaldeído 3,7%, acrescido de 10% de TRITON 100X, onde foram fixados durante 1 hora. Posteriormente, foram lavados em solução de PBS, com 0,3% de BSA, por mais 1 hora. Sob solução de glicerol acrescida de Hoechst 33342 (1µg/mL), os embriões foram colocados entre lâmina e lamínula e observados em microscópio de epifluorescência, sob excitação de comprimento de onda de 380nm. Para o cálculo dos núcleos corados foi utilizado o programa computacional ImageJ (Java, 2005).

### 5.3.7 Transcrição reversa

Sessenta e seis blastocistos eclodidos D9 (33 fecundados *in vitro* e 33 partenogênicos) foram individualmente submetidos à síntese de DNA complementar (cDNA), por transcrição reversa (RT-PCR), utilizando o kit “ImProm-II™ (Reverse Transcriptase” Promega, Madison, WI, EUA).

Cada embrião foi incubado durante 5 minutos, à 70°C, com 1µL de oligo(dT) (0,5µg/µL) e 1µL de água livre de RNase, e imediatamente resfriado à 4°C, para adição de 5µL de tampão de reação 5x, 1µL de enzima transcriptase reversa (Improm-II®, Promega, EUA), 1µL de dNTPs (10mM cada), 1µL de RNase OUT (1U/µL – Invitrogen), em um volume final de 20 µL. As amostras foram aquecidas à 42°C, por 1 hora, seguido de 70°C, por 15 minutos e utilizadas, em seguida, na reação de PCR em tempo real. O restante do cDNA foi armazenado à -20°C.

### 5.3.8 Avaliação do gene do IFN- $\tau$ pela PCR em Tempo Real de blastocistos eclodidos FIV e partenogênicos

As amplificações foram realizadas em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System). Nas reações para quantificação do gene do IFN- $\tau$  foi utilizada a coloração TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O GAPDH (“glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”) foi utilizado como gene constitutivo, para normalização dos dados. Os oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas para mensurar a frequência dos transcritos do GAPDH e do IFN- $\tau$  estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Seqüência dos *primers* e sondas utilizadas no experimento.

Gene	Seqüência de <i>primers</i>
GAPDH	F: 5'--3' AAGGCCATCACCATCTTCCA
	R: 5'--3' CCACTACATACTCAGCACCAGCAT
	S: 5'--3' VIC-AGCGAGATCCTGCCAACATCAAGTGG-TAMRA
IFN- $\tau$	F: 5'--3' CCT TCG TGC TCT CTC TAC TGA TG
	R: 5'--3' CAG GTA ACA ACC CAG AGA TCG TC
	S: 5'--3' FAM-CCG TAG CTG ACC AGC ACC-NFQ

Para a realização da PCR em tempo real utilizaram-se 0,25  $\mu$ M da sonda TaqMan® e 0,9 $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador, em reação de 20 $\mu$ L, para cada gene.

A reação teve início com incubação à 50°C, por 2 minutos, seguida de desnaturação à 95°C, por 10 minutos e 55 ciclos de 95°C, por 30 segundos e 60°C, por 45 segundos. Para as amplificações por PCR do GAPDH e IFN- $\tau$  foram utilizados 3 $\mu$ L da solução de cDNA total, de cada embrião, para cada tubo de reação. Cada amostra foi avaliada em duplicata e toda reação de PCR continha um controle livre de amostra.

### 5.3.9 PCR em tempo real

Para o cálculo da eficiência da reação da PCR, foi utilizado o software “LinRegPCR” (RAMAKERS et al., 2003), 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 estejam em fase logarítmica, mínimo de 4 pontos incluídos na regressão e alta correlação (Figura 1). A partir deste intervalo, foram calculados a eficiência e o *threshold*, que é o ponto médio dos limites determinados.

Utilizando-se o *threshold* calculado para cada gene, determinaram-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- $\tau$ ) e do gene controle endógeno (GAPDH), com normalização dos dados, realizada com os transcritos do gene GAPDH, e calibrado com um indivíduo (sessão 4).

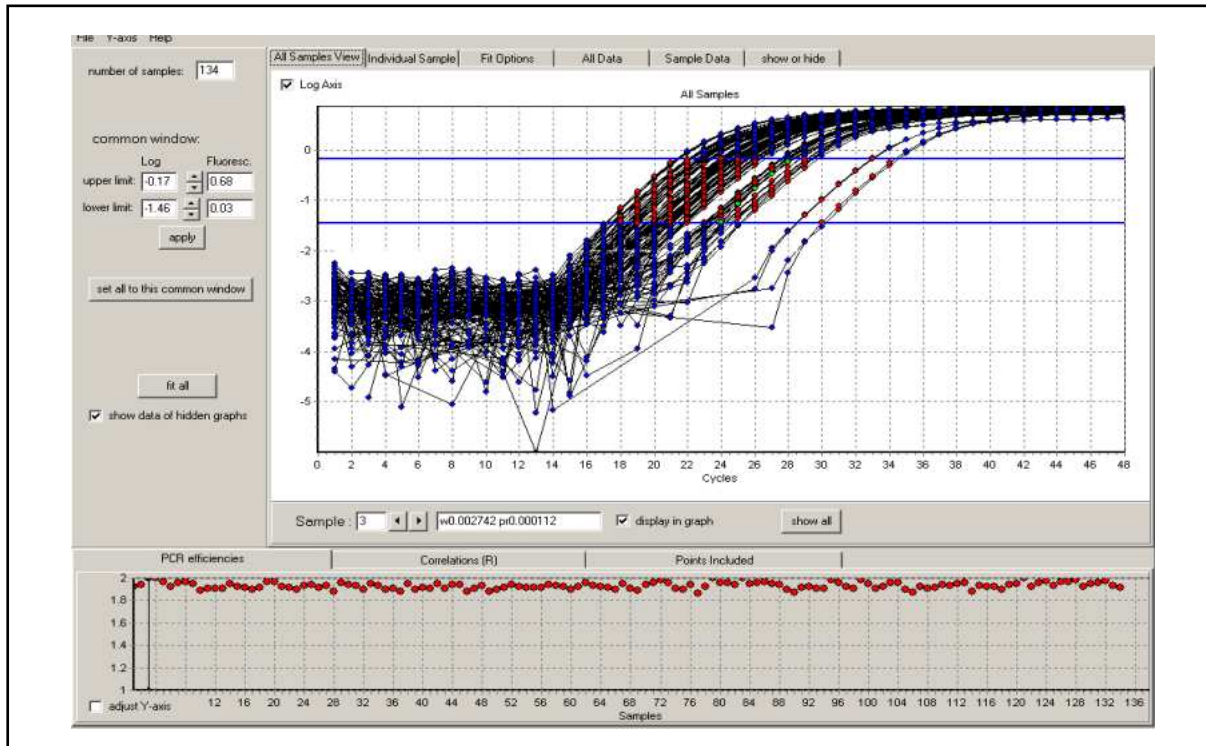


Figura 1. Exemplo de análise da curva de eficiência para cada poço individual através do software “LinRegPCR”, onde as linhas azuis do gráfico superior indicam intervalo analisado da curva de amplificação em sua fase exponencial, e o gráfico inferior mostra as eficiências calculadas

### 5.3.10 Análise estatística da PIV, contagem do número de núcleos e expressão relativa do gene do IFN- $\tau$ de embriões FIV e partenogênicos.

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2001). A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias entre os tratamentos foram previamente verificadas



pelo Teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e Teste de Hartley (OTT, 1983), respectivamente.

Obedecendo-se às premissas estatísticas citadas, os dados foram submetidos à análise de variância pelo *General Linear Model* (PROC GLM). Quando observada diferença significativa entre as sessões ( $P < 0,05$ ), as suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey, e diferenças entre os tratamentos pelo teste F, a um nível de significância de 5%.

As variáveis respostas: taxa de clivagem, taxa de blastocisto, taxa de blastocisto eclodido, número de núcleos e expressão relativa do gene do IFN- $\tau$  foram submetidas às análises descritas acima.

O modelo matemático utilizado para o cálculo de cada variável dependente foi a soma do efeito da sessão com o efeito do tratamento e o efeito da interação entre ambos (sessão x tratamento).

### **5.3.11 Imunocitoquímica para observação da presença do IFN- $\tau$ em embriões eclodidos**

Após 9 dias de cultivo, embriões fecundados *in vitro* (n=33) e partenogênicos (n=33) foram inicialmente lavados em gotas de 100  $\mu$ l de PBS com 0,1% de PVP (10ml/0,01g) e fixados posteriormente a 3,7% de paraformaldeído.

Em seguida foram lavados novamente e permeabilizados com 0,5% de Triton 100X, 0,1% de citrato de sódio em PBS a 0,1% PVP por 1 hora à temperatura ambiente, lavados novamente e pré-incubados com tampão de bloqueamento (2%BSA, 0,2% leite em pó desnatado, 2% soro de cabra e 0,8% Triton X-100 em PBS a 0,1% de PVP) também por 1 hora.

Após esse período, foi feita a primeira incubação com anticorpo de coelho anti-IFN- $\tau$  em PBS (1:100). Todos foram lavados e incubados com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho) na mesma concentração do anticorpo primário. Todas as incubações foram realizadas por uma hora à temperatura ambiente e as lavagens em três gotas de solução PBS a 0,1% PVP.

### 5.3.12 Eletroforese unidimensional e *Western blotting*

Para detecção da proteína do IFN- $\tau$ , por *Western blotting*, foram produzidos *in vitro* tanto embriões fecundados, quanto partenogénéticos. No 9º dia de cultivo embrionário (D9), os blastocistos eclodidos foram transferidos aleatoriamente para gotas de 35 $\mu$ L, com meio SOF, suplementado com 10% de SFB e cultivados em grupos de seis embriões até o 12º dia (D12).

Quinze embriões fecundados D12, quinze partenogénéticos D12, 10  $\mu$ L do meio de cultivo à 10% SFB do grupo fecundado, 10  $\mu$ L do meio de cultivo à 10% do grupo partenogénético e meio de cultivo sem embriões foram submetidos à eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE).

As amostras foram submetidas à eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida à 12% e as proteínas transferidas durante uma hora para uma membrana de difluorido de polivinilideno (PVDF; Hybond-P, GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, UK) pelo método semi-seco. Incubou-se cada membrana com solução bloqueadora (leite em pó desnatado à 5% em solução tampão de Tris-salina –10 mM Tris, 0,16 Molar NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,6; TBST) por 8 a 12 horas em mesa refrigerada à 4°C. Em seguida, cada membrana foi incubada por duas horas, com um anticorpo anti-bIFN- $\tau$  diluído a 1:2000, em solução bloqueadora, doado gentilmente pelo Dr. Michael Roberts (Universidade do Missouri, USA). Após lavagem com TBST, procedeu-se a incubação com anticorpo secundário diluído a 1:33.000 em TBST por uma hora. A detecção do bIFN- $\tau$  foi feita pela incubação das membranas com os reagentes do kit de detecção de quimiluminescência ECL-Plus (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, UK) e exposição a filmes radiográficos.

As imagens digitalizadas dos filmes radiográficos foram submetidas à análise densitométrica pelo software ImageMaster 1D v.4.10 (Pharmacia Biotech Inc., USA) para determinação das densidades ópticas das bandas protéicas detectadas e o cálculo dos seus pesos moleculares.

## 5.4 SEGUNDA E TERCEIRA ETAPAS

### 5.4.1 Sincronização do ciclo estral das receptoras de embriões

Para as transferências dos embriões (TE) da segunda e terceira etapas, foram utilizadas 239 fêmeas nulíparas, provenientes de cruzamento ( $\frac{1}{2}$  zebu e  $\frac{1}{2}$  europeu), com no mínimo 350 kg de peso vivo e com exames de brucelose e tuberculose negativos, mantidas em sistema de pastagem, formada por *Brachiaria brizanta var marandu*, com suplementação mineral e água *ad libitum*.

Para a sincronização do ciclo estral das fêmeas, foram utilizados agentes farmacológicos que possibilitaram a transferência dos embriões em tempo fixo (TETF), isto é, sem a necessidade de observação do cio.

Os animais receberam implantes auriculares silásticos (Crestar<sup>®</sup>), contendo 3 mg de norgestomet, associados a uma injeção intramuscular com 2 mg de benzoato de estradiol (BE) para obtenção de uma nova onda folicular.

As fêmeas permaneceram com os implantes, durante um período de 8 dias e, no dia da remoção dos implantes (D8), todos os animais receberam uma aplicação intramuscular de 7,5 mg de luprostiol (Prosolvil<sup>®</sup>), para assegurar a luteólise e, 24 horas depois, receberam uma dose intramuscular de 1,0 mg de BE, como agente sincronizador das ovulações.

### 5.4.2 Aspiração folicular *in vivo* guiada por ultra-sonografia

A aspiração folicular *in vivo* foi realizada utilizando um aparelho de ultra-sonografia, modelo Aloka SSD 500, equipado com transdutor setorial intravaginal de 5MHz e dispositivo-guia para punção folicular. Foi realizada anestesia epidural nas doadoras (lidocaína 2%) e os folículos, com diâmetro superior a três milímetros, foram identificados e puncionados, utilizando-se agulhas 18G e pressão de vácuo de 80 mmHg, (aproximadamente 14ml de água/minuto). O líquido folicular aspirado foi inicialmente recuperado em tubos de 50ml, contendo de 10 a 15 ml de DPBS, acrescido de 10% de soro fetal bovino e 10UI/ml de heparina e os oócitos foram posteriormente separados em filtro de coleta de embriões (75 $\mu$ m).

### 5.4.3 Superovulação e colheita de embriões fecundados *in vivo*

Para obtenção dos embriões fecundados *in vivo*, doadoras das raças Nelore e Gir foram superovuladas no 10º dia do ciclo estral com FSH (Pluset®, Serozo Veterinária) na dosagem de 350 UI, fracionada em oito doses, administradas a cada 12 horas, por via IM. Cada fêmea recebeu duas doses IM de 1,0 mg de PGF<sub>2α</sub>, após 60 e 72h do início da superovulação e foi submetida a duas inseminações artificiais.

Os embriões foram coletados no sétimo dia após a IA, em meio DPBS, e foram eqüitativamente distribuídos e inovulados nas receptoras, associados ou não com embriões partenogênicos.

### 5.4.4 Transferência dos embriões (TE)

De acordo com a classificação da Sociedade Internacional de Transferência de embriões (IETS, 1998), os embriões graus 1 e 2 foram transferidos para as fêmeas nulíparas aptas à inovulação.

Para proporcionar uma divisão eqüitativa entre os grupos, as receptoras (figura 2) foram divididas em função do escore de condição corporal, conforme (RICHARDS et al., 1986) e em função da atividade ovariana, utilizando-se a classificação de 1, 2 ou 3 (MADUREIRA et al., 1987).

1) Fêmeas ciclando, com ovários com comprimento acima de 30mm, macios com presença de CL ou útero com turgidez acentuada denotando a presença de folículos grandes (> 10mm).

2) Fêmeas que possuem ovários com comprimento entre 15-30 mm, ausência de CL e turgidez no útero. Incluem-se, nesta categoria, fêmeas cujos folículos atingem a fase de dominância ( $\geq 8,5$ mm) mas não ovulam.

3) Fêmeas que possuem ovários pequenos, duros e lisos. Nesta categoria são incluídas fêmeas cujos folículos não chegam até a divergência.



Figura 2. Exemplo do padrão racial das receptoras utilizadas na Fazenda Araquá, Charqueada (SP).

#### 5.4.5 Diagnóstico de prenhez e avaliação das perdas embrionárias

Após 23 à 28 dias da data da TE, foi realizado o diagnóstico de gestação, via retal, mediante exame ultra-sonográfico, com utilização do aparelho ALOKA SSD 500 e um transdutor linear (5MHz), para verificação da presença do concepto e batimento cardíaco. Entre 53 e 60 dias de gestação, foi realizada novamente a ultrasonografia, para avaliação das perdas embrionárias ocorridas no período.

#### 5.4.6 Análise estatística das taxas de prenhez

A comparação das taxas de prenhez entre G1 e G2, e entre G3 e G4, foram analisadas com o auxílio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2001). A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias entre os tratamentos foram previamente verificadas pelo Teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e Teste de Hartley (OTT, 1983), respectivamente.

Obedecendo-se às premissas estatísticas citadas, os dados foram submetidos à análise de variância pelo *General Linear Model* (PROC GLM). Quando observada diferença significativa entre as sessões ( $P < 0,05$ ), as suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey, e diferenças entre os tratamentos pelo teste F, a um nível de significância de 5%.

As variáveis respostas: taxas de prenhez aos 30 dias e taxas de prenhez aos 60 dias foram submetidas às análises descritas acima para cada grupo experimental.

#### **5.4.7 Colheita de concepto partenogenético aos 21 dias de gestação**

Sete novilhas inovuladas com 2 embriões partenogenéticos foram abatidas após 14 dias da data da TE, para confirmação da sobrevivência do concepto partenogenético. As novilhas tiveram seus úteros recolhidos pós abate e levados ao LMMD à 4°C.

## 6 RESULTADOS

A seguir, serão apresentados os resultados da **primeira, segunda e terceira** etapas.

### 6.1 PRIMEIRA ETAPA

#### 6.1.1 Taxas de clivagem, taxas de blastocisto, taxas de blastocisto eclodido, contagem de número de núcleos e expressão relativa do gene do IFN- $\tau$ de embriões fecundados *in vitro* e partenogênicos.

Os resultados da produção *in vitro* dos embriões bovinos são apresentados na tabela 2, segundo tratamento (fecundação ou ativação partenogênica) e dia da sessão de produção embrionária, bem como da interação entre ambos, porque constituem os resultados diretamente ligados ao objetivo do presente estudo.

Para a taxa de clivagem, houve interação entre sessão embrionária e tratamento ( $P=0,004$ ). Assim, nas sessões 2, 4 e 5, houve efeito de sessões de produção embrionária dentro do tratamento para os embriões fecundados, mas não houve efeito de sessão dentro do tratamento para os embriões partenogênicos,

As taxas de clivagem, resultantes do tratamento para os embriões fecundados *in vitro* e partenogênicos, foram de 69,7% e 58,8%, respectivamente.

**Tabela 2** - Taxas de clivagem, blastocisto e blastocisto eclodido de embriões bovinos submetidos a 6 sessões de produção embrionária, segundo tratamento *in vitro*: fecundação (FIV) ou ativação partenogenética.

<b>Interações</b>				
<b>Sessão</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Clivagem (%)</b>	<b>Blastocisto (%)</b>	<b>Eclodido (%)</b>
1	FIV (n=135)	65,1	37,0	23,7
1	ATIVAÇÃO (n=145)	62,0	31,0	17,9
2	FIV (n=130)	83,8 <sup>a</sup>	45,3	30,0
2	ATIVAÇÃO (n=92)	63,0 <sup>b</sup>	25,0	14,1
3	FIV (n=201)	64,1	32,3	17,4
3	ATIVAÇÃO (n=188)	63,8	34,0	15,9
4	FIV (n=125)	80,0 <sup>m</sup>	36,0	18,4
4	ATIVAÇÃO (n=133)	53,3 <sup>n</sup>	36,0	14,2
5	FIV (n=151)	66,2 <sup>x</sup>	38,4	20,5
5	ATIVAÇÃO (n=143)	52,4 <sup>y</sup>	26,5	13,9
6	FIV (n=168)	64,8	43,4	20,8
6	ATIVAÇÃO (n=140)	58,5	41,4	16,4
<b>Efeitos principais</b>				
1	(n=280)	63,5	33,9	20,7
2	(n=222)	75,1	36,9	23,4
3	(n=389)	64,0	33,1	16,7
4	(n=258)	66,2	36,0	16,2
5	(n=294)	59,5	32,6	17,3
6	(n=308)	62,0	42,5	18,8
	FIV (n=910)	69,7	38,4 <sup>a</sup>	21,4 <sup>a</sup>
	ATIVAÇÃO (n=841)	58,8	32,8 <sup>b</sup>	15,5 <sup>b</sup>
<b>Probabilidades</b>				
Sessão		0,024	0,116	0,447
Tratamento		0,001	0,005	0,001
Sessão x Trat		0,004	0,074	0,406



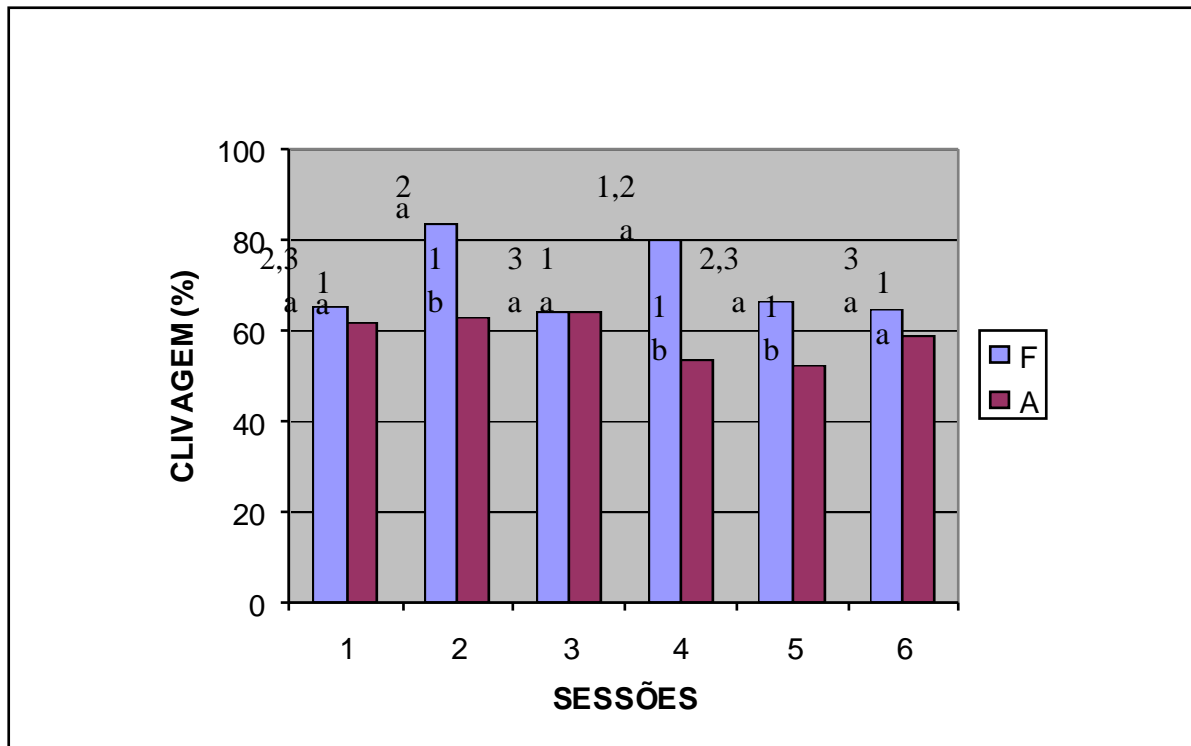


Figura 3 - Efeito do tratamento para taxa de clivagem (F: fecundação; A: ativação partenogenética) durante 6 sessões de produção embrionária. a,b - colunas com letras diferentes sobrescritas diferem tratamento dentro da sessão; 1,2,3 - colunas com números diferentes sobrescritos diferem sessão dentro de tratamento.

Para taxa de blastocisto, não houve interação envolvendo as variáveis, sessão embrionária e tratamento ( $P=0,074$ ), não houve efeito de sessão ( $P=0,116$ ) e houve efeito de tratamento. As taxas de blastocisto foram de 38,4% para os fecundados, e de 32,8% para os partenogenéticos ( $P=0,059$ ).

Para a taxa de eclosão, não houve interação envolvendo as variáveis, sessão embrionária e tratamento ( $P=0,406$ ), não houve efeito de sessão ( $P=0,447$ ) e houve efeito de tratamento. As taxas de blastocisto eclodido foram de 21,4 % para os fecundados, e de 15,5 % para os partenogenéticos ( $P=0,001$ ).

Os resultados da contagem do número de núcleos e expressão relativa do gene do IFN- $\tau$  dos embriões fecundados *in vitro* e partenogenéticos são apresentados na tabela 3.

**Tabela 3** - Número de núcleos e expressão relativa do gene do IFN- $\tau$  de embriões bovinos submetidos a 6 sessões de produção embrionária, segundo tratamento *in vitro* (fertilização ou ativação partenogenética).

<b>Interações</b>			
<b>Sessão</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Número de núcleos</b>	<b>Expressão relativa do gene IFN-<math>\tau</math></b>
1	FIV (n=6)	219,3 $\pm$ 26,5	-2,200 $\pm$ 0,90
1	ATIVACÃO (n=6)	186,5 $\pm$ 61,8	-0,900 $\pm$ 0,05
2	FIV (n=6)	259,5 $\pm$ 44,9	-1,680 $\pm$ 0,77
2	ATIVACÃO (n=6)	146,8 $\pm$ 26,3	-1,098 $\pm$ 0,21
3	FIV (n=6)	205,1 $\pm$ 45,7	1,020 $\pm$ 0,44
3	ATIVACÃO (n=6)	142,6 $\pm$ 39,6	1,700 $\pm$ 0,22
4	FIV (n=6)	240,8 $\pm$ 74,5	0,060 $\pm$ 0,01
4	ATIVACÃO (n=6)	143,3 $\pm$ 58,0	0,120 $\pm$ 0,88
5	FIV (n=6)	217,3 $\pm$ 47,0	1,300 $\pm$ 0,76
5	ATIVACÃO (n=6)	172,1 $\pm$ 92,5	1,760 $\pm$ 0,61
6	FIV (n=6)	244,1 $\pm$ 79,8	1,300 $\pm$ 0,87
6	ATIVACÃO (n=6)	136,0 $\pm$ 27,3	1,580 $\pm$ 0,98
<b>Efeitos principais</b>			
1	(n=12)	202,9 $\pm$ 44,1	-1,550 $\pm$ 0,47 <sup>c</sup>
2	(n=12)	203,1 $\pm$ 35,6	-1,389 $\pm$ 0,49 <sup>c</sup>
3	(n=12)	173,8 $\pm$ 42,6	1,360 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>
4	(n=12)	192,0 $\pm$ 66,2	0,090 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>
5	(n=12)	194,7 $\pm$ 69,7	1,530 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>
6	(n=12)	190,0 $\pm$ 53,5	1,440 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>
	FIV (n=36)	231,0 $\pm$ 53,0 <sup>a</sup>	-0,033 $\pm$ 0,62 <sup>x</sup>
	ATIVACÃO (n=36)	156,0 $\pm$ 50,9 <sup>b</sup>	0,527 $\pm$ 0,48 <sup>y</sup>
<b>Probabilidades</b>			
Sessão		0,220	0,001
Tratamento		0,001	0,001
Sessão x Trat		0,102	0,074

Para a variável dependente, número de núcleos, não houve interação envolvendo as variáveis, sessão embrionária e tratamento ( $P=0,102$ ). Não houve efeito de sessão ( $P=0,220$ ), mas houve efeito de tratamento, com médias de  $231 \pm 53$  núcleos para os embriões fecundados, e de  $156 \pm 50$  núcleos para os partenogênicos ( $P=0,001$ ).

Para comparação das médias da expressão relativa do gene do IFN- $\tau$  entre embriões fecundados *in vitro* e partenogênicos, não houve interação envolvendo as variáveis, sessão embrionária e tratamento ( $P=0,074$ ). Houve efeito de sessão ( $P=0,001$ ), e também houve efeito de tratamento ( $P=0,001$ ), com médias de expressão gênica de  $(-0,033 \pm )$  para os fecundados, e de  $(0,527 \pm )$  para os partenogênicos.

Para determinar a curva padrão e o cálculo do  $R^2$  (Figura 5), foram realizadas diluições seriadas de cDNA, tanto para o gene GAPDH quanto para o gene do IFN- $\tau$

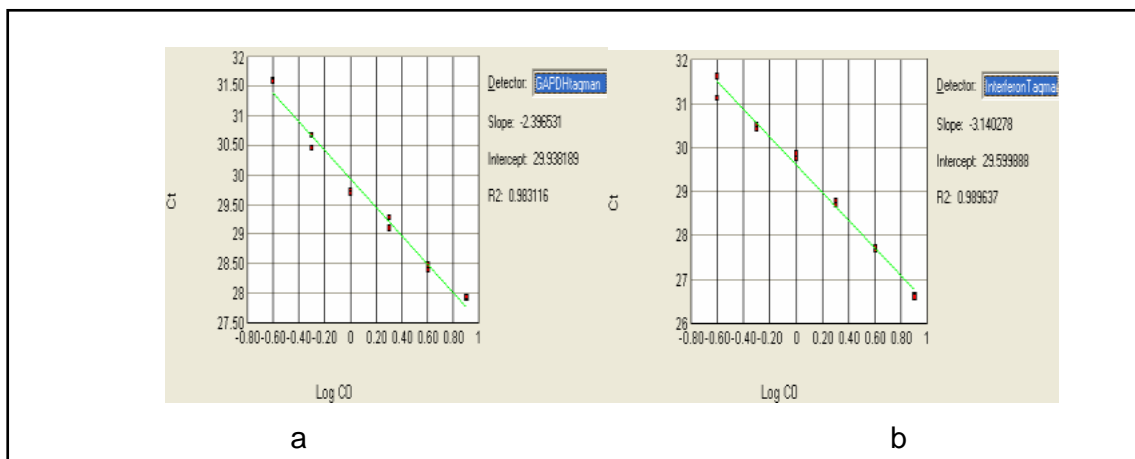


Figura 4. Curva padrão correspondente aos genes GAPDH (a) IFN- $\tau$  (b) em diferentes diluições. a)  $R^2=0,9831$ ; b)  $R^2=0,9896$

### 6.1.2 Estimativa do diâmetro de embriões fecundados e partenogênicos.

Como resultados complementares aos objetivos diretos no presente trabalho, foi realizada a estimativa do tamanho do diâmetro de embriões fecundados e partenogênicos.

No nono dia de cultivo embrionário, conforme a figura 6, verificou-se que os embriões fecundados têm diâmetro médio de  $160 \pm 25 \mu\text{m}$ , enquanto os partenogênicos, média de  $170 \pm 37 \mu\text{m}$ , e estes diâmetros não diferiram ( $P>0,05$ ).

Após doze dias de cultivo, conforme a figura 7, as médias dos embriões fecundados e partenogênicos, foram de  $530 \pm 30 \mu\text{m}$  e  $520 \pm 33 \mu\text{m}$  respectivamente, e também não houve diferença entre os diâmetros ( $P > 0,05$ ).

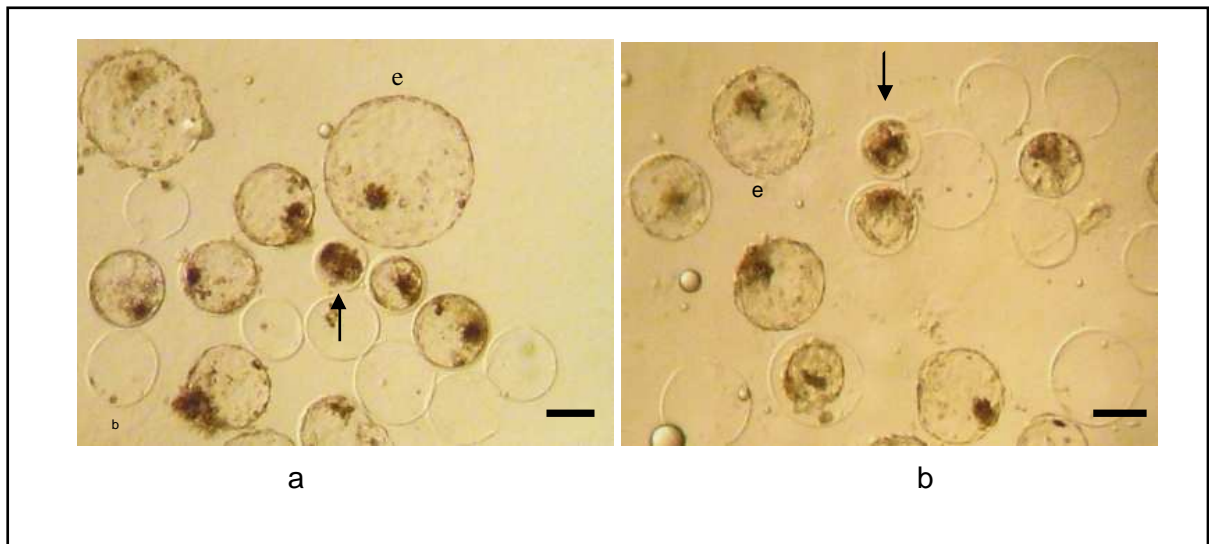


Figura 5. Cultivo embrionário aos 9 dias. O diâmetro do embrião (e) foi estimado em comparação com o do oócito (setas) colocado no momento da foto. A) Fecundação *in vitro*; B) Ativação partenogênética. Barras representam  $100 \mu\text{m}$ .

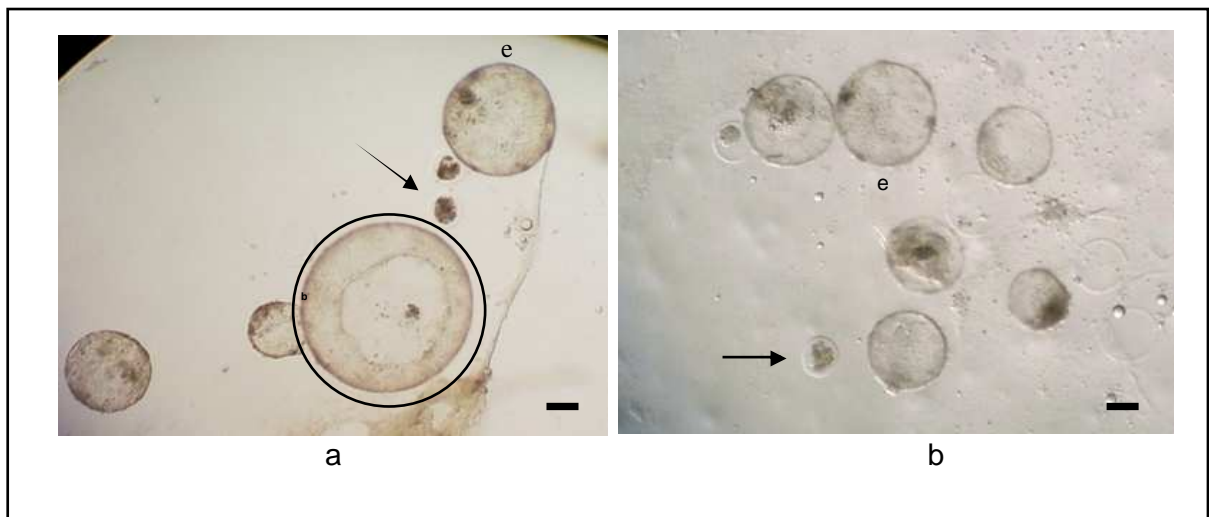


Figura 6. Cultivo embrionário aos 12 dias. O diâmetro do embrião (e) foi estimado em comparação com o do oócito (setas) colocado no momento da foto. A) Fecundação *in vitro*; B) Ativação partenogênética. Barras representam  $100 \mu\text{m}$ . Dentro do círculo um blastocisto de  $620 \mu\text{m}$ .

### 6.1.3 Imunocitoquímica

Conforme a figura 8, a presença de células produtoras de IFN- $\tau$  foi detectada, pela técnica de imunocitoquímica, tanto nos embriões fecundados *in vitro*, quanto nos partenogénéticos.

### 6.1.4 Identificação do IFN- $\tau$ pela técnica do *Western blotting*

Uma banda com 24kDa foi detectada nas amostras dos meios de cultivo embrionário dos embriões fecundados e nos meios dos partenogénéticos, mas não foi detectado nas amostras que continham os embriões (Figura 9).

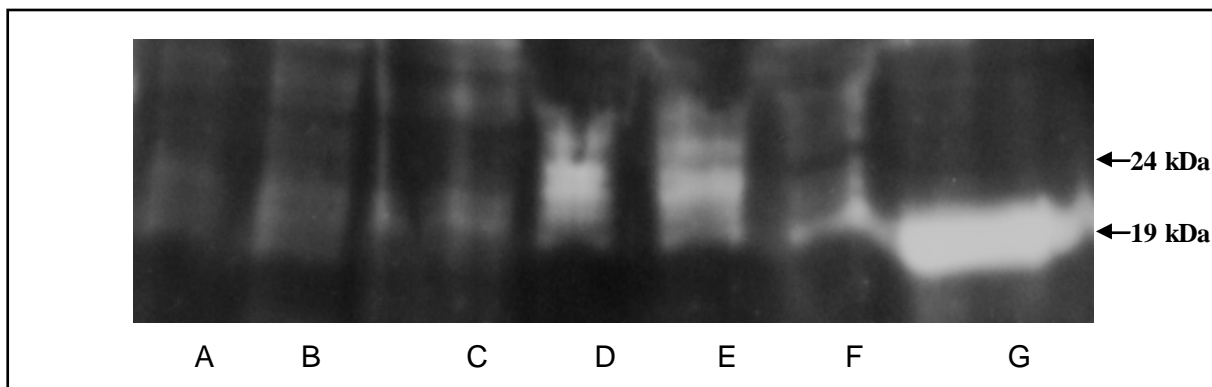


Figura 7. *Western blotting* para detecção da proteína do IFN- $\tau$  em meios de cultivo onde permaneceram seis embriões do D9 ao D12. A) Controle negativo; B) Quinze embriões FIV D12; C) Quinze embriões partenogénéticos D12; D) Meio de cultivo dos embriões FIV; E) Meio de cultivo dos embriões partenogénéticos; F) Meio de cultivo com 10% SFB e G) rIFN- $\tau$ .

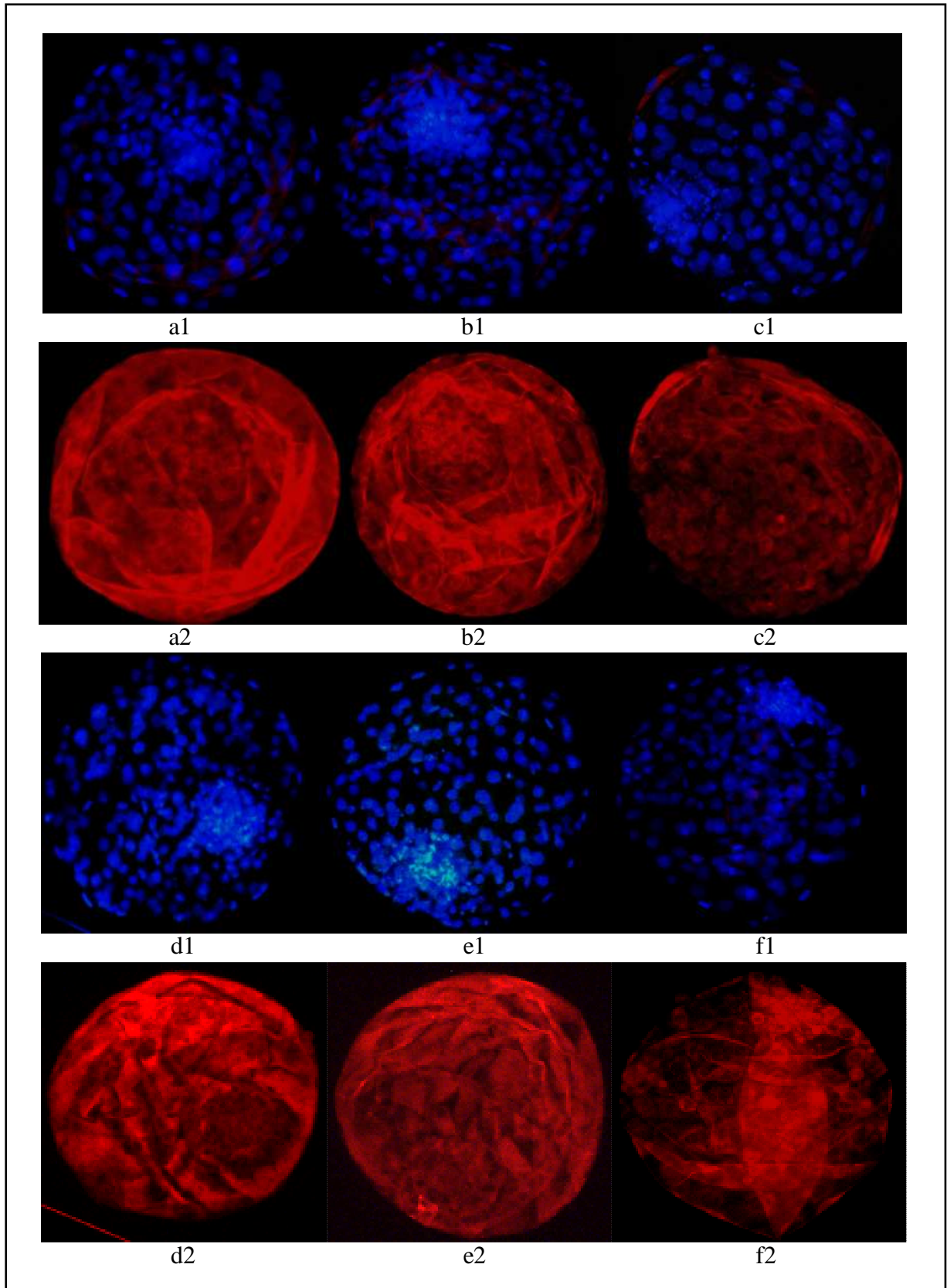


Figura 8. Blastocistos eclodidos após 9 dias de cultivo. A, B e C: Fecundados; D, E e F: partenogénéticos. As letras correspondem aos indivíduos. 1) coloração em Hoesch (azul), para contagem do número de núcleos. 2) Imunocitoquímica (vermelho), para detecção de células produtoras de IFN- $\tau$ .

### 6.1.5 Número de núcleos dos embriões fecundados e partenogénéticos no 7º dia de cultivo.

Na Tabela 4 está apresentada o número de núcleos dos embriões fecundados e partenogénéticos, no 7º dia de cultivo.

**Tabela 4.** Número de núcleos dos embriões fecundados e partenogénéticos, no estágio de blastocisto, após 7 dias de cultivo.

Grupo	Núcleos totais (DP)
FIV (n=20)	109,0 ± 25,2 <sup>a</sup>
Partenogénéticos (n=20)	98,7 ± 59,2 <sup>b</sup>

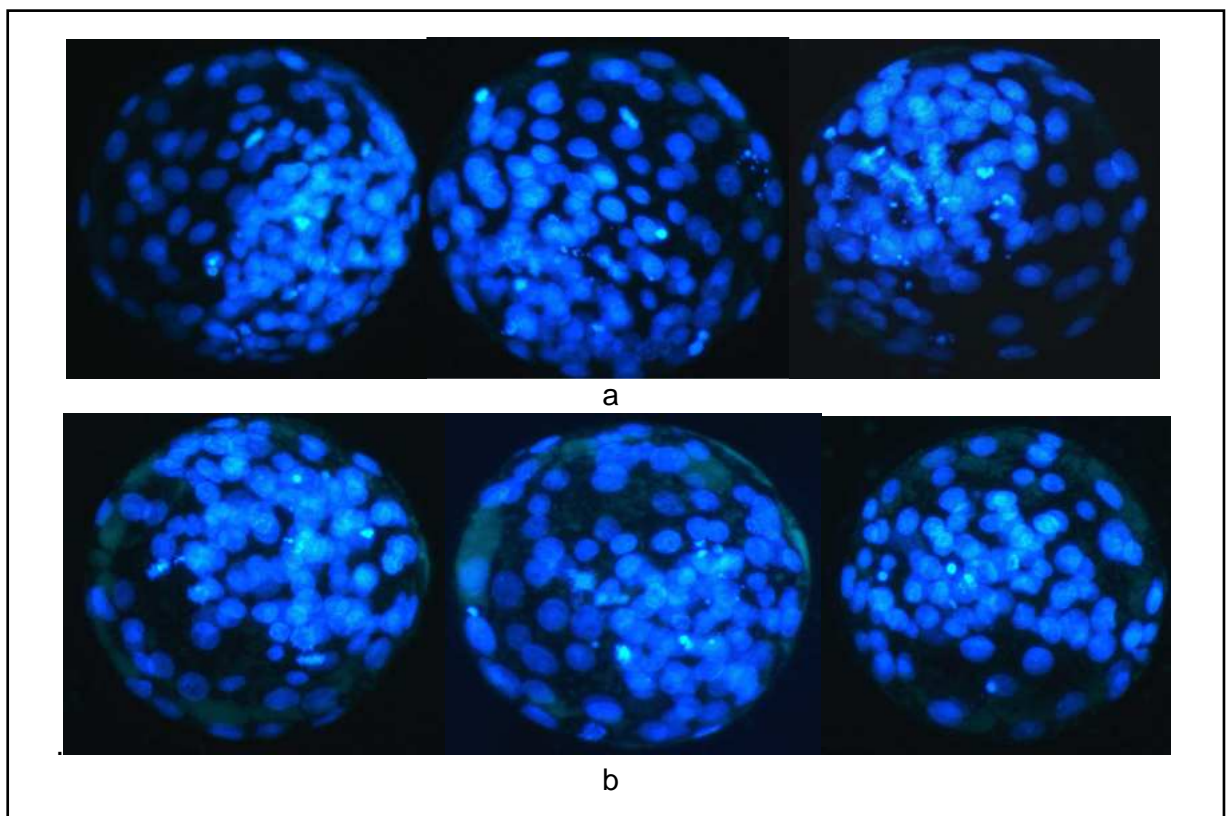


Figura 9. Blastocistos após 7 dias de cultivo: a) fecundados b) partenogénéticos

### 6.1.6 Expressão relativa do gene do IFN- $\tau$ de embrião partenogenético colhido aos 21 dias de gestação

A expressão relativa do gene do IFN- $\tau$ , de embrião colhido aos 21 dias de gestação, está apresentada na figura 10. Em relação ao gene endógeno GAPDH, o partenogenético expressou o gene do IFN- $\tau$  aos 21 dias de desenvolvimento.

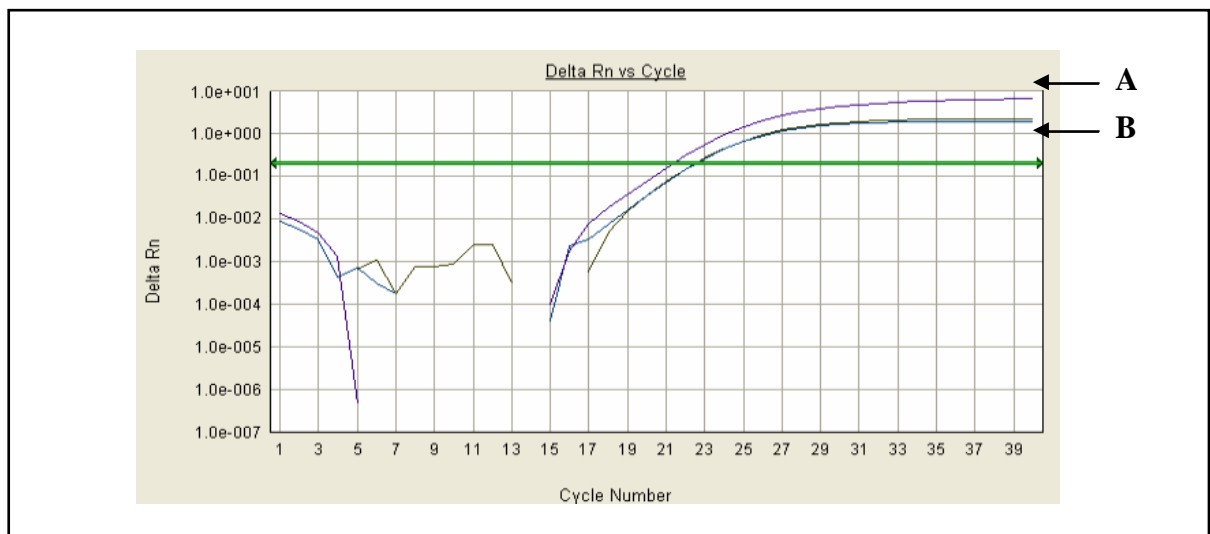


Figura 10. Amplificação relativa do gene do IFN- $\tau$  em relação ao GAPDH de embrião partenogenético aos 21 dias. A) IFN- $\tau$ ; B) GAPDH.

## 6.2 SEGUNDA ETAPA

### 6.2.1 Taxas de prenhez aos 30 dias (TP 30d) e aos 60 dias (TP 60d), para embriões fecundados *in vitro*, associados ou não a um embrião partenogenético.

Os resultados das TP 30 dias e TP 60 dias são apresentados na tabela 5, segundo sessão de transferência de embriões e tratamento, bem como da interação entre ambos, porque se constituem nos resultados diretamente ligados ao objetivo do presente estudo.



**Tabela 5** - Taxas de prenhez (TP 30d e TP 60d) em receptoras bovinas nulíparas, segundo sessão de PIV e tratamento.

<b>Interações</b>			
<b>Sessão</b>	<b>Tratamento</b>	<b>TP 30d (%)</b>	<b>TP 60d (%)</b>
1	G1 (n=09)	22,2	11,1
1	G2 (n=09)	11,1	11,1
2	G1 (n= 07)	14,2	14,2
2	G2 (n=07)	14,2	14,2
3	G1 (n= 05)	60,0	60,0
3	G2 (n=05)	20,0	20,0
4	G1 (n=05)	60,0	60,0
4	G2 (n=05)	40,0	40,0
5	G1 (n=16)	40,0	13,3
5	G2 (n=15)	12,5	12,5
6	G1 (n=15)	31,2	25,0
6	G2 (n=16)	66,6	46,6
7	G1 (n=08)	57,1	42,8
7	G2 (n=07)	62,5	62,5
8	G1 (n=21)	35,2	17,6
8	G2 (n=17)	23,8	19,0
<b>Efeitos principais</b>			
1	(n= 18)	16,6 <sup>b</sup>	11,1 <sup>b</sup>
2	(n=14)	14,2 <sup>b</sup>	14,2 <sup>b</sup>
3	(n=10)	40,0 <sup>a,b</sup>	40,0 <sup>a,b</sup>
4	(n=10)	50,0 <sup>a,b</sup>	50,0 <sup>a,b</sup>
5	(n=31)	25,8 <sup>b</sup>	12,9 <sup>b</sup>
6	(n=31)	48,3 <sup>a,b</sup>	35,4 <sup>a,b</sup>
7	(n=15)	60,0 <sup>a</sup>	52,6 <sup>b</sup>
8	(n=38)	28,9 <sup>a,b</sup>	18,4 <sup>a,b</sup>
	G1 (n=86)	31,3	24,6
	G2 (n=81)	37,0	28,2
<b>Probabilidades</b>			
Sessão		0,033	0,003
Tratamento		0,281	0,924
Sessão x Trat		0,195	0,463

G1) inovulação com 1 embrião fecundado *in vitro*; G2) inovulação com 1 embrião fecundado *in vitro*, associado a 1 embrião partenogenético.

Para a taxa de prenhez aos 30 dias, não houve interação ( $P=0,195$ ) entre sessão de PIV e tratamento (inovulação com 1 embrião fecundado *in vitro*, ou inovulação com 1 embrião fecundado *in vitro*, associado a 1 embrião partenogenético).

Houve efeito da sessão da PIV ( $P=0,033$ ) e não houve diferença significativa entre as TP 30 dias, resultantes da inovulação de apenas 1 embrião fertilizado *in vitro*, ou associado a um embrião partenogenético.

A taxa de prenhez aos 30 dias, para o G1 foi de 31,3% e, para o G2, de 37,0% ( $P=0,281$ ).

Para a taxa de prenhez aos 60 dias, não houve interação ( $P=0,463$ ) entre sessão de PIV e tratamento.

Houve efeito da sessão da PIV ( $P=0,003$ ), e não houve diferença significativa entre as TP 60 dias, resultantes da inovulação de apenas 1 embrião fertilizado *in vitro*, ou associado a um embrião partenogenético ( $P=0,924$ ).

As taxas de prenhez aos 60 dias para o G1 e G2 foram 24.6% e 28.2%, respectivamente.

### **6.3 TERCEIRA ETAPA**

#### **6.3.1 Taxas de prenhez aos 30 dias (TP 30d) e aos 60 dias (TP 60d), para embriões fecundados *in vivo*, associados ou não a um embrião partenogenético.**

Os resultados das TP 30 dias e TP 60 dias são apresentados na tabela 6, segundo sessão de transferência de embriões e tipo de tratamento, bem como da interação entre ambos, porque se constituem os resultados diretamente ligados ao objetivo do presente estudo.

**Tabela 6** - Taxas de prenhez (TP 30d e TP 60d) em receptoras bovinas nulíparas, segundo sessão de TE e tratamento.

<b>Interações</b>			
<b>Sessão</b>	<b>Tratamento</b>	<b>TP 30d (%)</b>	<b>TP 60d (%)</b>
1	G3 (n=19)	68,4	61,1
1	G4 (n=19)	68,4	66,6
2	G3 (n=12)	50,0	25,0
2	G4 (n=12)	75,0	50,0
3	G3 (n=05)	20,0	10,0
3	G4 (n=05)	100,0	75,0
<b>Efeitos principais</b>			
1	(n=38)	68,4	65,7
2	(n=24)	62,5	37,5
3	(n=10)	60,0	40,0
	G3 (n=36)	55,5 <sup>a</sup>	44,4 <sup>x</sup>
	G4 (n=36)	75,0 <sup>b</sup>	61,1 <sup>y</sup>
<b>Probabilidades</b>			
Sessão		0,824	0,064
Tratamento		0,007	0,084
Sessão x Trat		0,056	0,535

G3) inovulação com 1 embrião fecundado *in vivo*; G4) inovulação com 1 embrião fecundado *in vivo* associado a 1 embrião partenogénético.

Para a taxa de prenhez aos 30 dias, não houve interação (P=0,056) entre sessão de TE e tratamento.

Não houve efeito da sessão da TE (P=0.824) e houve diferença significativa entre as TP 30 dias resultantes da inovulação de apenas 1 embrião fertilizado *in vivo* ou associado com um embrião partenogénético .

A taxa de prenhez aos 30 dias para os animais do G3 foi de 55,5% e, para o G4 de 75,0%(P=0,007).

Para a taxa de prenhez aos 60 dias, não houve interação (P=0,535) envolvendo as variáveis, sessão de TE e tratamento.

Não houve efeito da sessão da TE ( $P=0,064$ ), e não houve diferença significativa entre as TP 60 dias, resultantes da inovação de apenas 1 embrião fertilizado *in vivo*, ou associado a um embrião partenogénético ( $P=0,084$ ).

As taxas de prenhez aos 60 dias para os animais do G3 e G4 foram 44,4% e 61,1%, respectivamente.

#### 6.4 NASCIMENTOS DE BEZERROS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Foi monitorado o nascimento dos dois primeiros nascimentos pertencentes a este trabalho, o primeiro bezerro pertencente ao G1, e nasceu aos 287 dias com 28 kg, e o segundo bezerro, originário do G2, nasceu aos 296 dias com 34 kg (Figura 12).



Figura 11. Figura a: Bezerros produzidos *in vitro* originários do G1 e G2 (da esquerda para direita). Figura b: Doadora dos óocitos com os bezerros. Figura c: Receptora do G1 com bezerro; Figura d: Receptora do G2 com o bezerro.

Nas tabelas 7 e 8 estão apresentados raça, sexo, pesos e dias de gestação dos animais nascidos pertencentes ao G1 e G2.

**Tabela 7.** Raça, sexo, peso e dias de gestação dos animais correspondentes ao grupo dos embriões fecundados *in vitro* (G1)

<b>Grupo</b>	<b>Raça</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Dias de Gestação</b>
G1	Gir	Macho	28	287
G1	Gir	Fêmea	22	284
G1	Gir	Fêmea	25	288
G1	Gir	Macho	25	290
G1	Girolando	Macho	27	296
G1	Girolando	Macho	31	297
Média			26,3 ±1,2	290,3 ±1,1

**Tabela 8.** Raça, sexo, peso e dias de gestação dos animais correspondentes ao grupo dos embriões fecundados *in vitro* associados a partenogênicos(G2)

<b>Grupo</b>	<b>Raça</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Dias de Gestação</b>
G2	Gir	Macho	34	296
G2	Gir	Macho	30	299
G2	Gir	Fêmea	25	290
G2	Gir	Fêmea	26	288
G2	Girolando	Macho	31	297
G2	Girolando	Macho	29	296
G2	Girolando	Fêmea	27	284
Média			28,8 ±2,1	292,8 ±2,1

As médias do peso ao nascimento dos animais pertencentes ao G1 e G2 foram de 26,3 Kg ±1,2 e 28,8 Kg ±2,1 (P=0,41) respectivamente. As médias dos dias de gestação das receptoras dos grupos G1 e G2 foram de 290 dias ±1,1 e 292,8 dias ±2,1 (P=0,34) respectivamente.

## 7 DISCUSSÃO

Na primeira etapa experimental, foram realizadas técnicas que permitissem comprovar que o embrião partenogenético seria capaz de expressar o gene e secretar a proteína do IFN- $\tau$ .

Na segunda e terceira etapas, o objetivo foi avaliar o efeito na taxa de prenhez de receptoras bovinas nulíparas, após transferência de embriões fecundados *in vitro*, ou *in vivo*, associados ou não a um embrião partenogenético.

Na primeira etapa, os resultados obtidos foram apresentados para as médias das taxas de clivagem, de blastocisto, de blastocisto eclodido, de número de núcleos e expressão relativa do gene do IFN- $\tau$ , e indicam que podem existir diferenças entre embriões fecundados e partenogenéticos, dependendo da variável analisada.

Estas diferenças podem existir em função da sessão de produção embrionária, já que os resultados das variáveis acima citadas, foram calculados em função do dia, em que se iniciava uma sessão de produção *in vitro* de embriões, e o delineamento prospectivo utilizado desta etapa trabalho foi realizado em arranjo fatorial 6x2.

Comparou-se a média das taxas de clivagem entre os tratamentos, e ao final das seis sessões de produção embrionária, houve diferença entre as médias de clivagem, e estes resultados estão de acordo com os resultados de Kubish et al, 2003.

A diferença na taxa de clivagem, entre embriões fecundados e partenogenéticos ocorreu nas sessões 2, 4 e 5 ( $P < 0,001$ ), e não houve diferença nas sessões 1, 3 e 6 ( $P > 0,05$ ).

Ao analisar os resultados de cada tratamento, as taxas de clivagem dos embriões fecundados diferiram no decorrer das sessões, enquanto para os embriões partenogenéticos, não se observou diferença no número de embriões clivados entre as sessões.

Houve também diferenças nas taxas de blastocisto ( $P = 0,005$ ) e blastocisto expandido ( $P = 0,001$ ), entre os embriões fecundados e partenogenéticos, diferenças também encontradas por Kubish et. al, 2003.

Para avaliar os embriões partenogenéticos, foram realizadas as contagens dos números de núcleos, no 9º dia de desenvolvimento, e comparadas com os embriões fecundados *in vitro* ( $P = 0,001$ ).

Os resultados obtidos neste trabalho, estão de acordo com Uranga e Arechaga (1997), Van de Velde et al. (1999), Kubisch et al. (2003), que o embrião partenogenético possui menor número de células, comparado ao embrião produzido por fecundação *in vitro*.

Em relação aos resultados apresentados para a expressão relativa do gene do IFN- $\tau$ , para os embriões fecundados e partenogenéticos, não houve interação entre as variáveis ( $P=0,074$ ), mas observou-se que houve efeito da sessão de produção embrionária ( $P=0,001$ ), e houve também efeito de tratamento. Os embriões partenogenéticos expressaram significativamente mais o gene do IFN- $\tau$ , em relação aos embriões fecundados *in vitro* no 9º dia ( $P=0,001$ ).

Neste trabalho, o efeito principal da rotina de produção dos embriões, influenciou a expressão do gene do IFN- $\tau$ , tanto para os partenogenéticos, quanto os fecundados *in vitro*. Isto sugere que os embriões produzidos *in vitro* podem expressar de maneira distinta o gene do IFN- $\tau$ , de acordo com a sessão em que estes embriões foram produzidos.

Outro ponto a ser discutido, é o sexo dos embriões fecundados *in vitro* em relação à produção de IFN- $\tau$ . Em 2001, Larson et al. afirmaram que blastocistos fêmeas produzem uma concentração maior de proteínas de IFN- $\tau$ , em relação à produção dos blastocistos machos, cultivados nas mesmas condições. Os autores sugeriram que a expressão do gene do IFN- $\tau$  não é afetada pela falta do cromossomo paterno.

Em outros trabalhos, os autores compararam a concentração em meios de cultura de INF- $\tau$  de embriões partenogenéticos e fecundados e também concluíram que os embriões partenogenéticos secretaram uma quantidade similar de IFN- $\tau$  em relação aos embriões do sexo feminino, e o dobro em relação aos embriões do sexo masculino (KUBISCH et al., 2003; RASMUSSEN e JOHNSON, 2003).

No presente trabalho, embriões fecundados e partenogenéticos, cultivados por 12 dias, e os meios de cultivo onde permaneceram os embriões, foram submetidos à técnica de *Western-blotting* para detecção da proteína do IFN- $\tau$ . Foi detectada uma banda com 24kDa, nas amostras dos meios de cultivo embrionário dos embriões fecundados, e nos meios dos partenogenéticos, mas não foi observado esta banda nos extratos embrionários.

Estes resultados sugerem que os embriões secretam a proteína do IFN- $\tau$ , e não a armazenam em quantidades suficientes, para ser detectadas pelo método aplicado nesta tese.

O rIFN- $\tau$  apresentou um peso molecular de 19kDa, condizente com outros relatos (Michael et al., 2006). Verificou-se que a banda protéica correspondente ao IFN- $\tau$ , encontrada nos meios de cultivo, onde permaneceram os embriões fecundados e nos meios dos partenogénéticos, apresentaram um peso molecular médio de 24 kDa, mesmo resultado de outros trabalhos (Bartol et al., 1985; Godkin et al., 1988).

Conforme as equipes de Bartol (1985); Geisert (1988) e Kubisch (2003), as células do trofoblasto iniciam a secreção da proteína do IFN- $\tau$  a partir do décimo dia de desenvolvimento, atingindo o pico máximo entre os dias 17 e 22 de gestação.

Como resultados complementares aos objetivos diretos no presente trabalho, ainda na primeira etapa experimental, detectaram-se as células produtoras de IFN- $\tau$ , mediante imunocitoquímica dos embriões fecundados *in vitro* e partenogénéticos no estágio de blastocisto eclodido.

Segundo Johnson et al. (2006), as células do trofoblasto, responsáveis pela produção do IFN- $\tau$ , estão localizadas em maior concentração adjacente à massa celular interna. Os autores realizaram a microscopia confocal de um blastocisto fecundado *in vitro* no 7º dia, e obtiveram uma imagem que permitiu chegar a essa conclusão, embora foi observada presença de células produtoras de IFN- $\tau$  em toda extensão do embrião.

No presente trabalho, foi estimado o diâmetro de blastocistos partenogénéticos e fecundados *in vitro*. Após 9 dias de cultivo, não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os diâmetros dos embriões partenogénéticos e fecundados, e no 12º dia de cultivo os diâmetros estavam maiores em relação ao nono dia, porém, também não houve diferença entre o diâmetro dos embriões ( $P>0,05$ ).

Dessa forma, não há diferença do tamanho do embrião partenogénético em relação aos fecundados *in vitro* até o 12º dia de desenvolvimento, e como a inibição da luteólise está relacionada com a produção de IFN- $\tau$ , e esta inibição depende da área do endométrio ocupada pelo concepto, embriões menos desenvolvidos têm menor chance de sobrevivência (BINELLI et al., 2001).



Com relação à contagem do número de núcleos no 7º dia, o objetivo foi comprovar que os embriões partenogenéticos eram viáveis de ser transferidos juntamente com os embriões fecundados, pelo menos com número mínimo de células que justificasse a inovulação.

Espera-se que nos embriões partenogenéticos, os genes de expressão materna comportem-se de maneira semelhante aos fecundados *in vitro* ou *in vivo*, e dessa forma, expressem o gene do IFN- $\tau$  e incrementem as taxas de prenhez, embora com um menor número de células, em relação aos fecundados, no dia da inovulação.

Porém, na segunda etapa do presente experimento, não foram observadas diferenças estatísticas nas taxas de prenhez aos 30 e 60 dias de gestação, do total de 167 receptoras bovinas nulíparas, que foram inovuladas com 1 embrião fecundado *in vitro*, ou inovuladas com 1 embrião fecundado *in vitro*, associado a 1 embrião partenogenético, mas houve efeito significativo da sessão de PIV.

Dessa forma, não houve diferença para as taxas de prenhez, mas ao final do período de 60 dias, houve um incremento de 14,6% na taxa de prenhez, quando um embrião fecundado *in vitro* foi transferido junto com partenogenético, e esse resultado, em se tratando que a técnica de Fecundação *in vitro*, é uma biotecnologia aplicada em animais de alto valor genético, um aumento de 14,6% na taxa de prenhez, pode representar um ganho financeiro considerável dependendo do acasalamento desejado.

Na terceira etapa deste trabalho, foram comparadas as médias das taxas de prenhez de 72 receptoras bovinas nulíparas após inovulação com 1 embrião fecundado *in vivo*, ou inovulação com 1 embrião fecundado *in vivo*, associado a 1 embrião partenogenético.

Neste experimento, as inovulações dos embriões foram realizadas em três dias diferentes, e para a TP 30 dias, houve diferença ( $P=0,007$ ) na taxa de prenhez quando um embrião fecundado *in vivo* foi transferido junto com um partenogenético.

Não foi observada diferença para a variável TP 60 dias ( $P=0,08$ ), mas com um valor próximo de ser considerado significativo, já que a diferença de 38,8% na taxa de prenhez aos 60 dias, quando um embrião partenogenético foi associado com embrião fertilizado *in vivo*, torna-se viável a utilização dessa estratégia como uma ferramenta importante para aumento da taxa de prenhez de bovinos.

Em relação às perdas embrionárias ocorridas no período de 30 a 60 dias da gestação, observaram-se valores de 14,8% para o G1, 33,3% para o G2, 25,0% para o G3 e 18,5% para o G4. Dessa forma, quando os embriões fecundados foram inovulados sozinhos, houve perda embrionária de 18,5% e quando foram associados a um partenogênético foi de 25,9%.

Como os partenogênicos não possuem cromossomos paternos, e estes são fundamentais para formação da placenta em ruminantes, será que a perda do embrião partenogênético ao redor dos 35-40 dias, prejudica o microambiente uterino determinante ao destino da gestação e o desenvolvimento do embrião fecundado?

Conforme Leiser e Kaufmann (1994), em bovinos, caprinos, ovinos e cervídeos a placentação é considerada temporalmente tardia e um processo relativamente não-invasivo. A placenta é constituída por seis camadas teciduais (endotélio materno, tecido conjuntivo materno, epitélio materno, trofoblasto, tecido conjuntivo embrionário e endotélio embrionário) que separam as circulações fetal e materna, sendo inicialmente diferenciadas à partir do 42º dia de gestação.

Assim, até o 42º dia de gestação, o desenvolvimento dos bovinos é conhecido como período embrionário, e a partir de então, como período fetal, e não há relatos que os embriões partenogênicos desenvolvam-se após essa data. No freemartinismo, as anastomoses dos vasos placentários iniciam-se a partir do 39º dia de gestação (DOMINGUEZ et al., 1990).

Sabe-se que embriões partenogênicos não progridem a termo, mas há relatos de prolongamento da duração do ciclo estral de bovinos de 32 dias, (SUSKOPARRISH et al., 1994) até 48 dias (FUKUI et al., 1992) após inovulação de embriões partenogênicos.

De acordo com Méo, (2005) fetos e membranas fetais de partenotos bovinos, ativados por ionomicina e 6-DMAP, apresentaram desenvolvimento até os 35 dias de gestação, porém de tamanho inferior a um embrião controle.

As equipes de Fukui (1992) e Loi (1998), constataram uma prenhez aos 35 dias de embrião partenogênético, porém não foram detectados batimentos cardíacos, e declararam que o tamanho do útero gravídico era menor em relação ao animal controle, que foi inseminado artificialmente.

Por sua vez, Hagemann et al. (1998) recuperaram fetos ovinos partenogênicos aos 21 dias de gestação, e declararam também apresentar

tamanho inferior em relação aos fetos decorrentes de monta natural, mas possuíam semelhança em tamanho e morfologia das membranas fetais.

Esses autores sustentaram a hipótese deste presente trabalho que, se há desenvolvimento até o 35º dia de gestação, o embrião partenogênético conseguiu inibir a luteólise durante o período crítico do reconhecimento materno.

Ainda na primeira etapa experimental, foi coletado o útero de um animal prenhe de embrião partenogênético, aos 21 dias de desenvolvimento, e dessa forma, também conseguiu-se afirmar que o embrião partenogênético ultrassou o 17º dia de gestação, dia crítico de reconhecimento materno da gestação.

O tempo de gestação de bezerros submetidos à associação com partenogênicos, no momento da inovulação, não diferiram em dias de gestação e peso ao nascimento. O primeiro nascimento pertencia ao G1 e nasceu aos 287 dias com 28 kg, e o segundo bezerro originário do G2, nasceu aos 296 dias com 34 kg, ambos do sexo masculinos, e pertencentes à raça Gir leiteiro.

Portanto, não houve comprometimento do desenvolvimento fetal do embrião fecundado *in vitro*, quando associado a um embrião partenogênético no momento da inovulação.

Como o reconhecimento materno embrionário, no período de peri-implantação, pode representar de 30 a 40% das perdas nas gestações de fêmeas bovinas (DISKIN e SREENAN 1980; ROCHE et al., 1981; HUMBLLOT 2001; SANTOS et al., 2004), torna-se cada vez mais importante o estudo do gene do IFN- $\tau$  para diminuição das perdas financeiras dos pecuaristas.

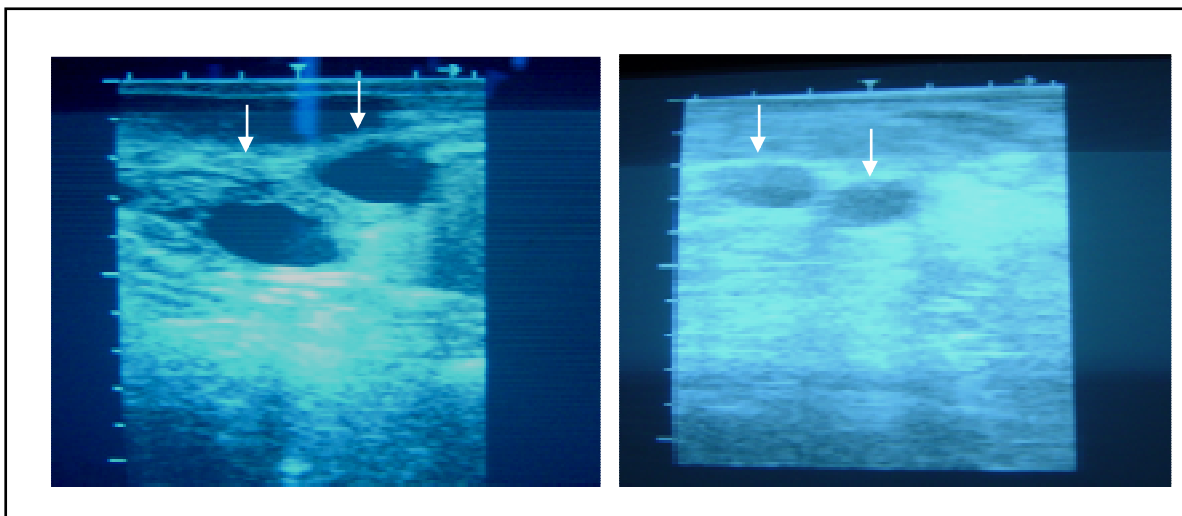
## 8 CONCLUSÕES

- Os embriões partenogênicos expressam o gene do IFN- $\tau$  e secretam a proteína do IFN- $\tau$ , no 9º dia de desenvolvimento embrionário.
- A transferência de um embrião partenogênico associado a embriões fecundados *in vitro* (P=0,924) ou *in vivo* (P=0,084), não favoreceu estatisticamente ao aumento da taxa de prenhez aos 60 dias de gestação, porém não prejudicou o desenvolvimento das gestações a termo em bovinos.

### Perspectivas:

Apesar de não observar vantagens na aplicação do partenogênico no aumento da taxa de gestação, a diferença observada na expressão do IFN- $\tau$  pode indicar que existe um efeito da sessão de PIV sobre a expressão e produção da proteína do IFN- $\tau$ . Seria então importante uma continuidade deste trabalho com inovulações de embriões expressando maior quantidade de RNAm do IFN- $\tau$ .

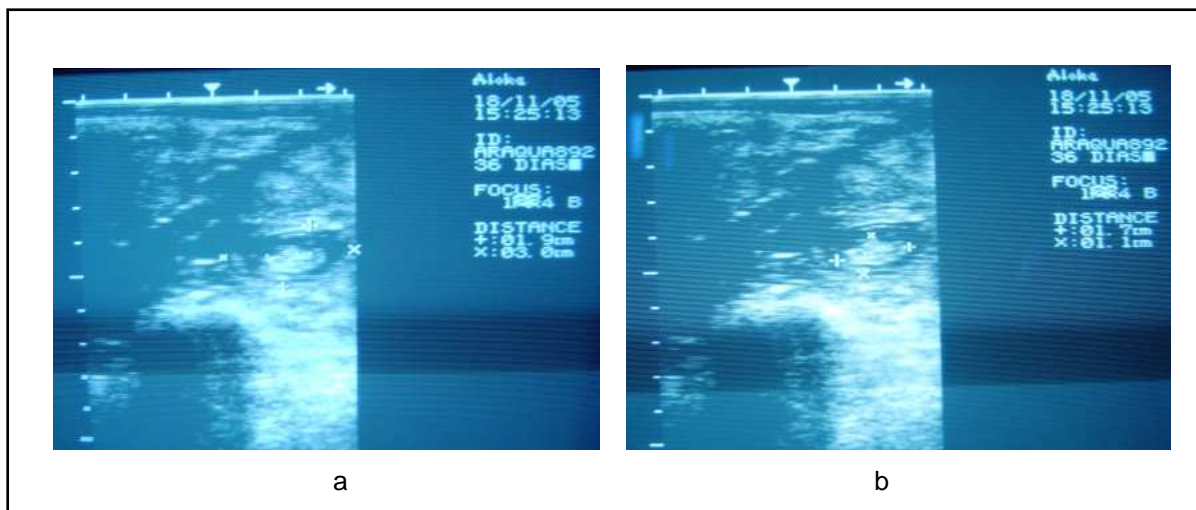
## 9 ANEXOS



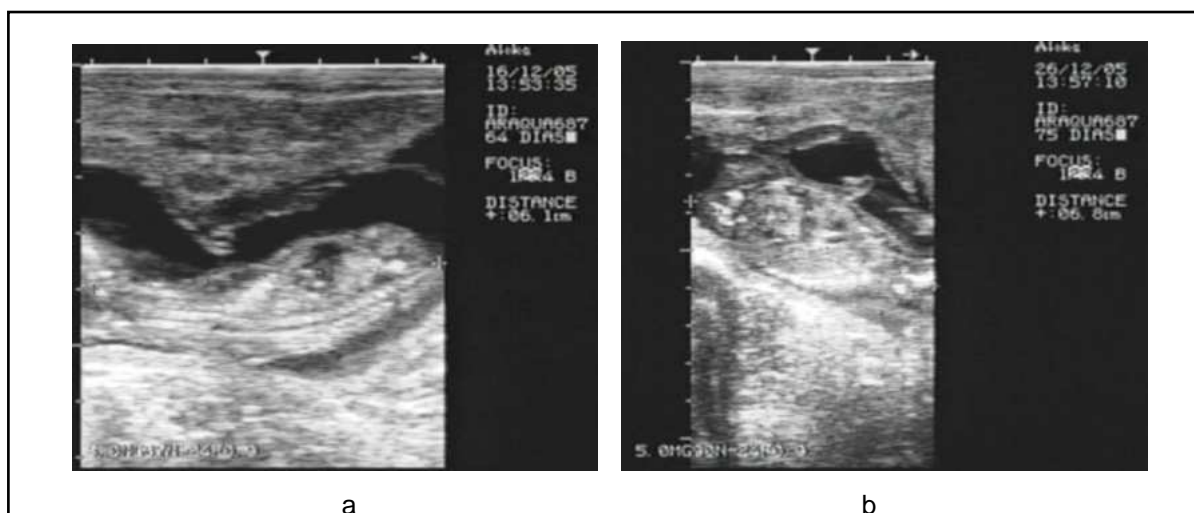
Anexo 1. Ultra-sonografia do útero de novilha involuvida com 1 embrião fecundado *in vitro* associado a 1 embrião partenogénico. As setas indicam a presença de 2 vesículas amnióticas aos 28 dias



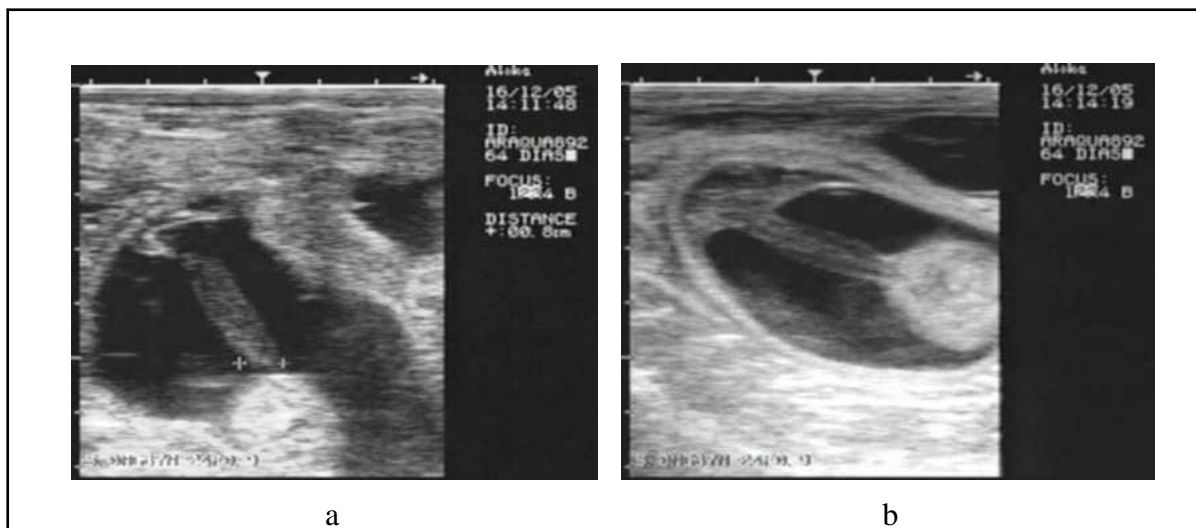
Anexo 2. Ultra-sonografia do útero de novilha do G2 aos 56 dias de gestação. Figura a: +) comprimento do cordão umbilical = 0.8 cm. Figura b: +) comprimento Crown-Rump = 4.6 cm.



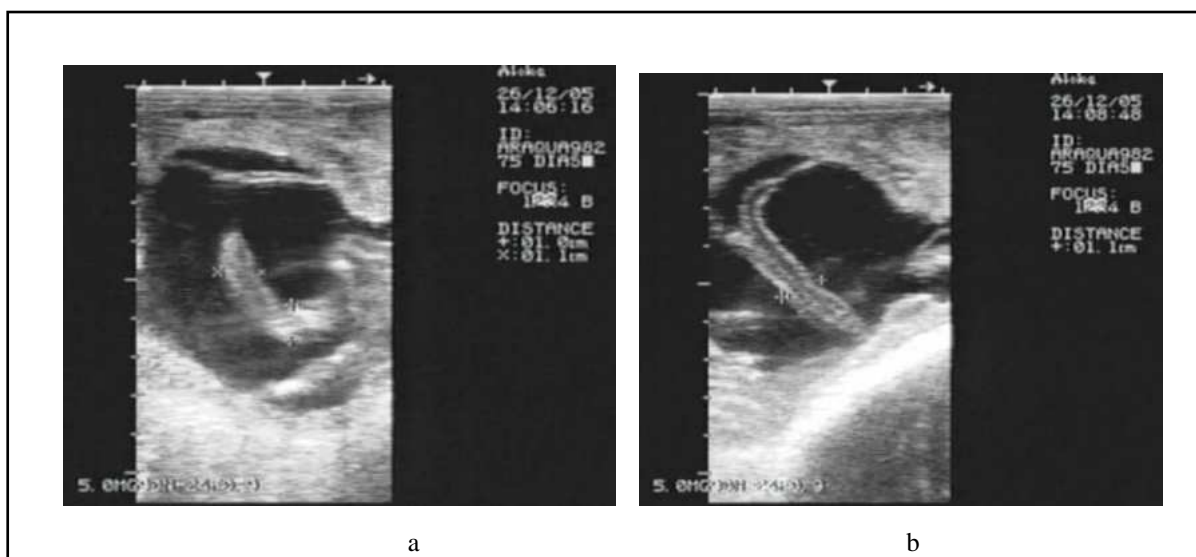
Anexo 3. Ultra-sonografia do útero de uma novilha aos 36 dias de gestação. Figura a: +) comprimento crânio-caudal da vesícula amniótica = 3.0 cm e x) comprimento dorso-ventral da vesícula amniótica = 1.09cm. Figura b: +) comprimento crânio-caudal do embrião = 1.7cm e x) comprimento dorso-ventral do embrião = 1.1 cm.



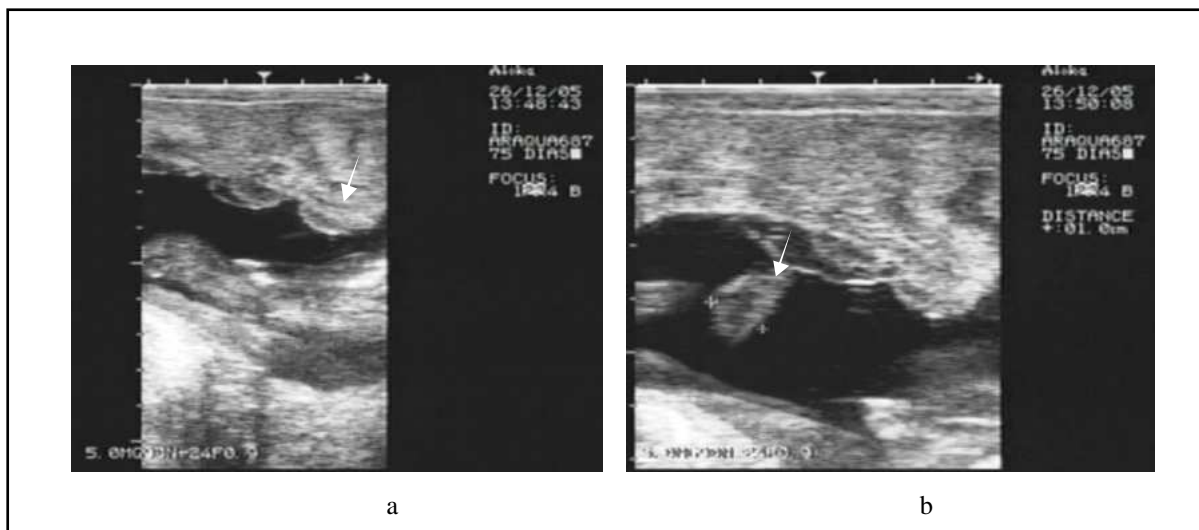
Anexo 4. Ultra-sonografia do útero de uma novilha aos 64 e 75 dias dias de gestação. Figura a: +) comprimento Crown-Rump aos 64 dias (6.1cm); Figura b: +) comprimento Crown-Rump aos 75 dias (6.8 cm).



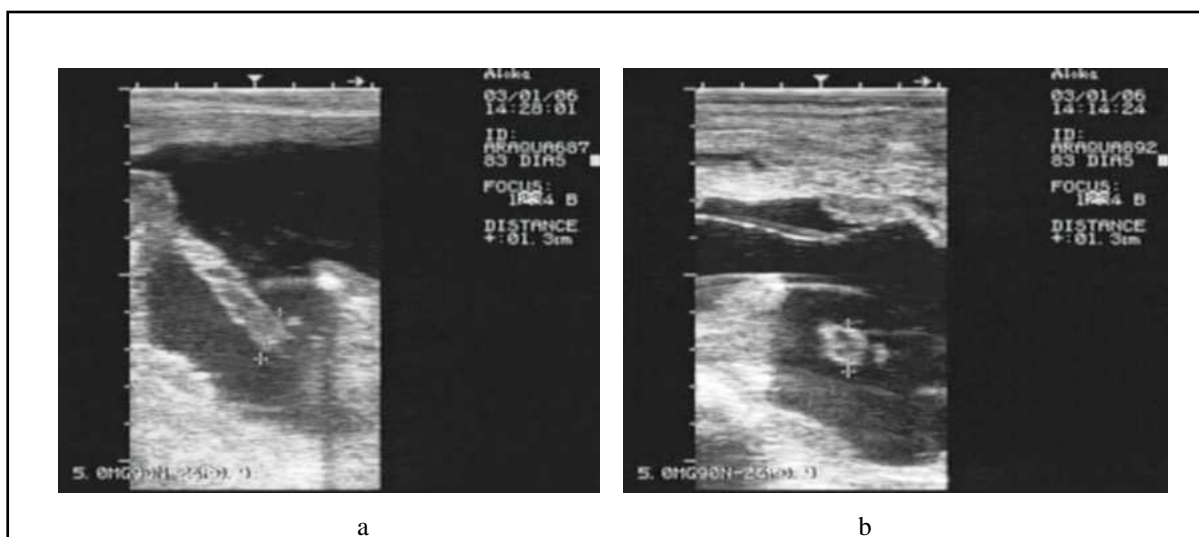
Anexo 5. Ultra-sonografia do útero de uma novilha aos 64 dias de gestação. Figura a: +) diâmetro do cordão umbilical (0.8cm). Figura b: ilustração do cordão umbilical.



Anexo 6 . Ultra-sonografia do útero de uma novilha aos 75 dias de gestação. Figuras a e b: +) diâmetro do cordão umbilical (1.1 cm).

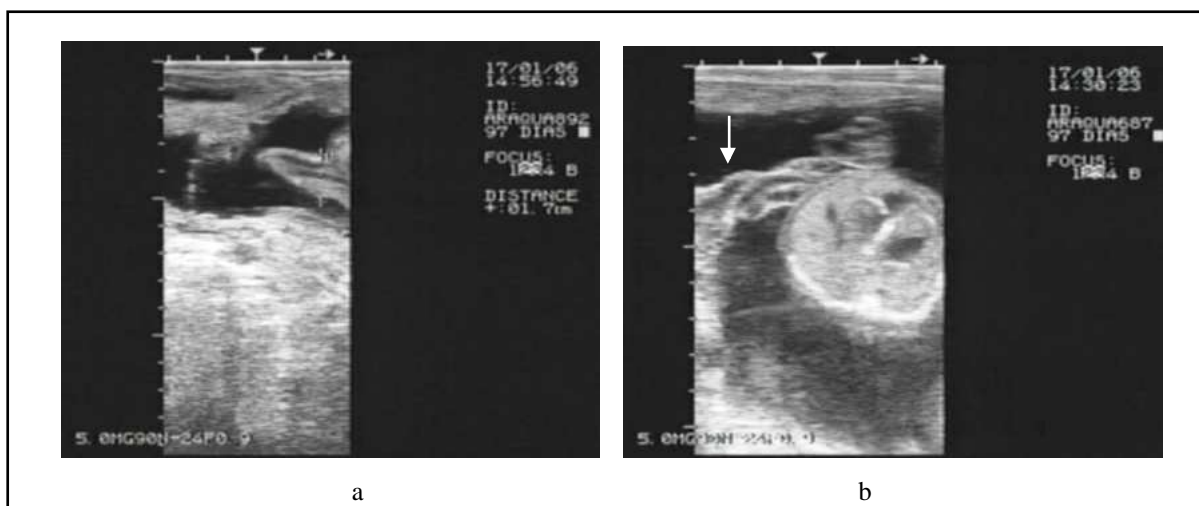


Anexo 7. Ultra-sonografia do útero de uma novilha aos 75 dias de gestação. Figura a: As setas indicam a formação do cordão umbilical na parte materna. Figura b: +) diâmetro do cordão umbilical (1.0 cm).

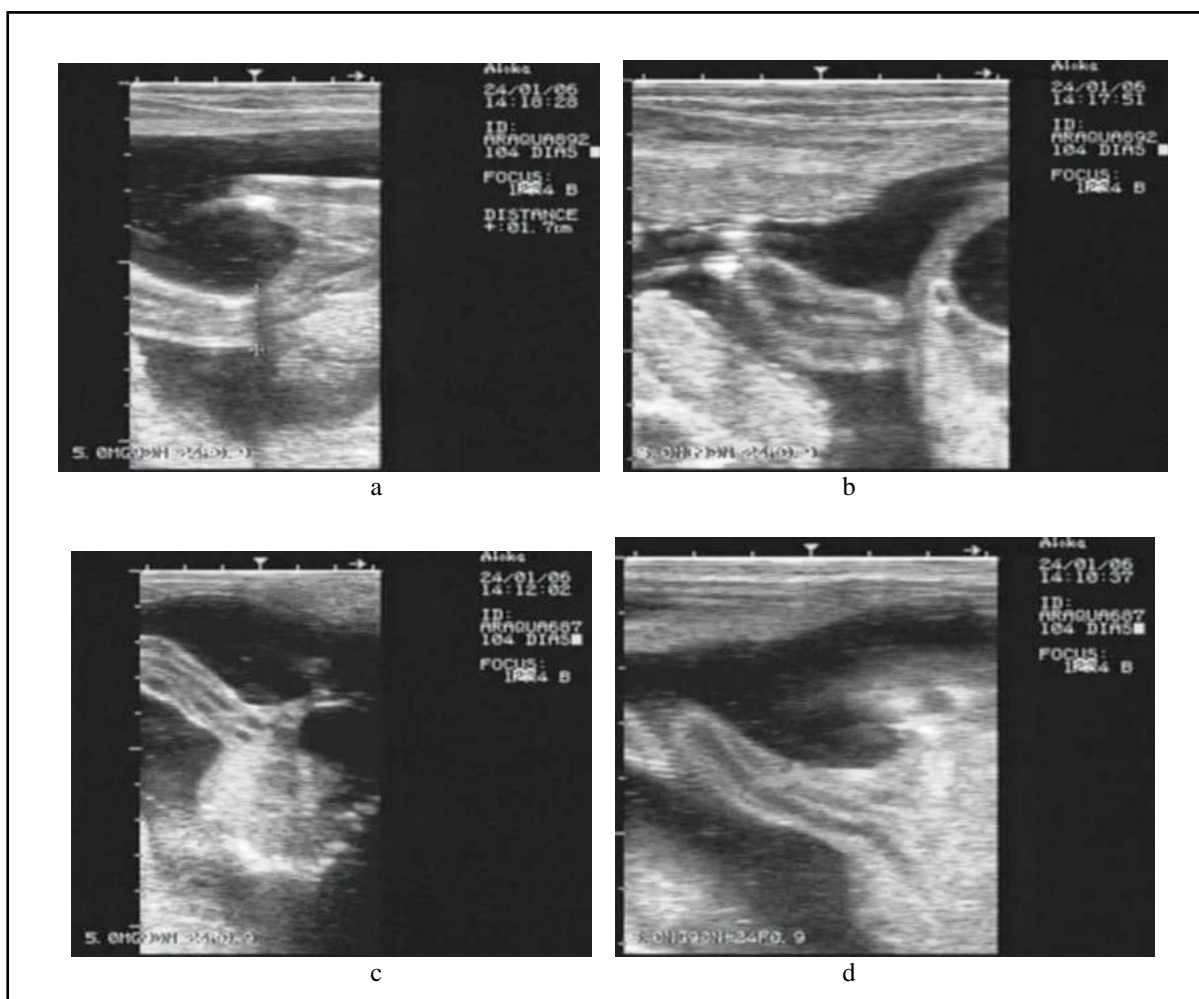


Anexo 8. Ultra-sonografia do útero de uma novilha aos 83 dias de gestação. Figuras a e b: +) diâmetro do cordão umbilical (1.3 cm).

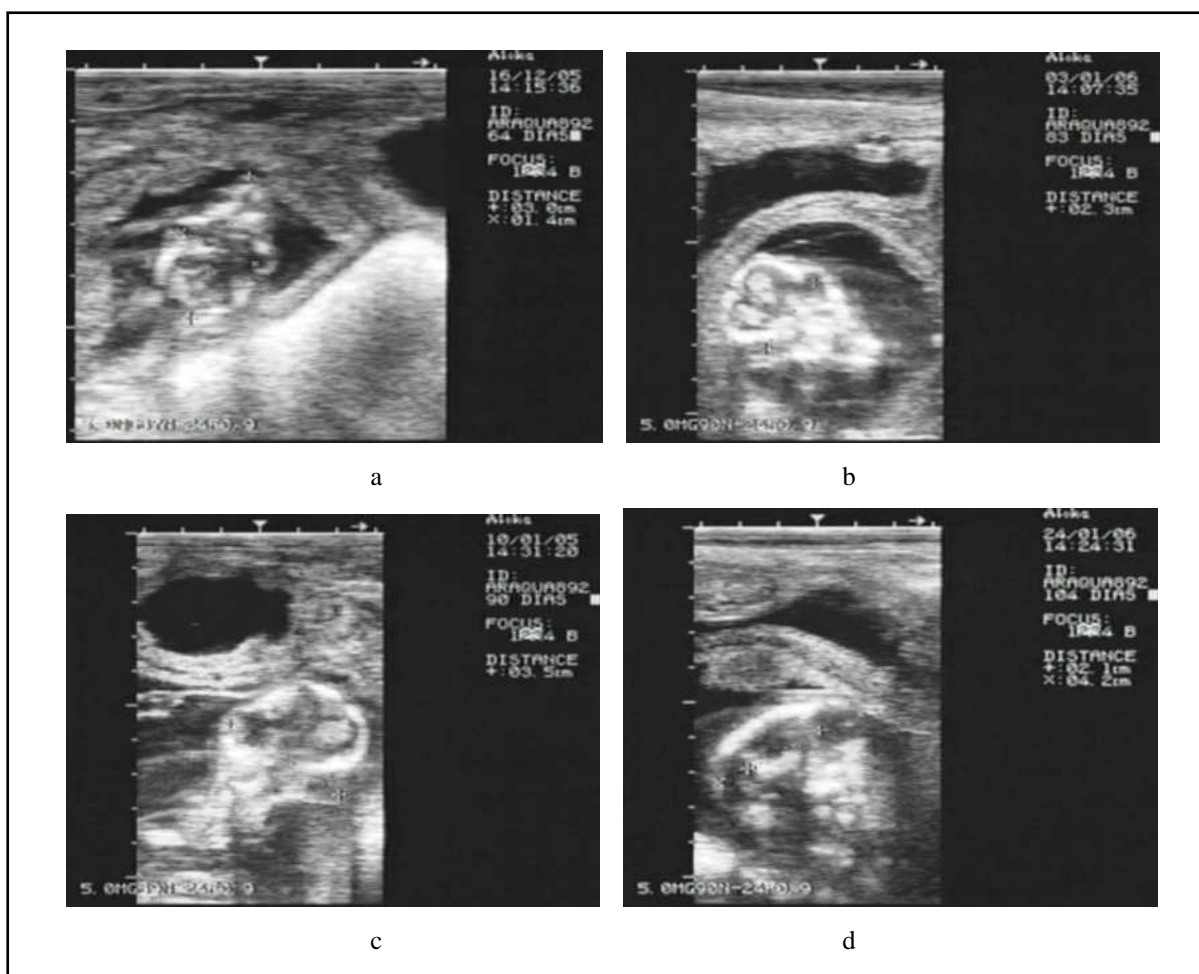




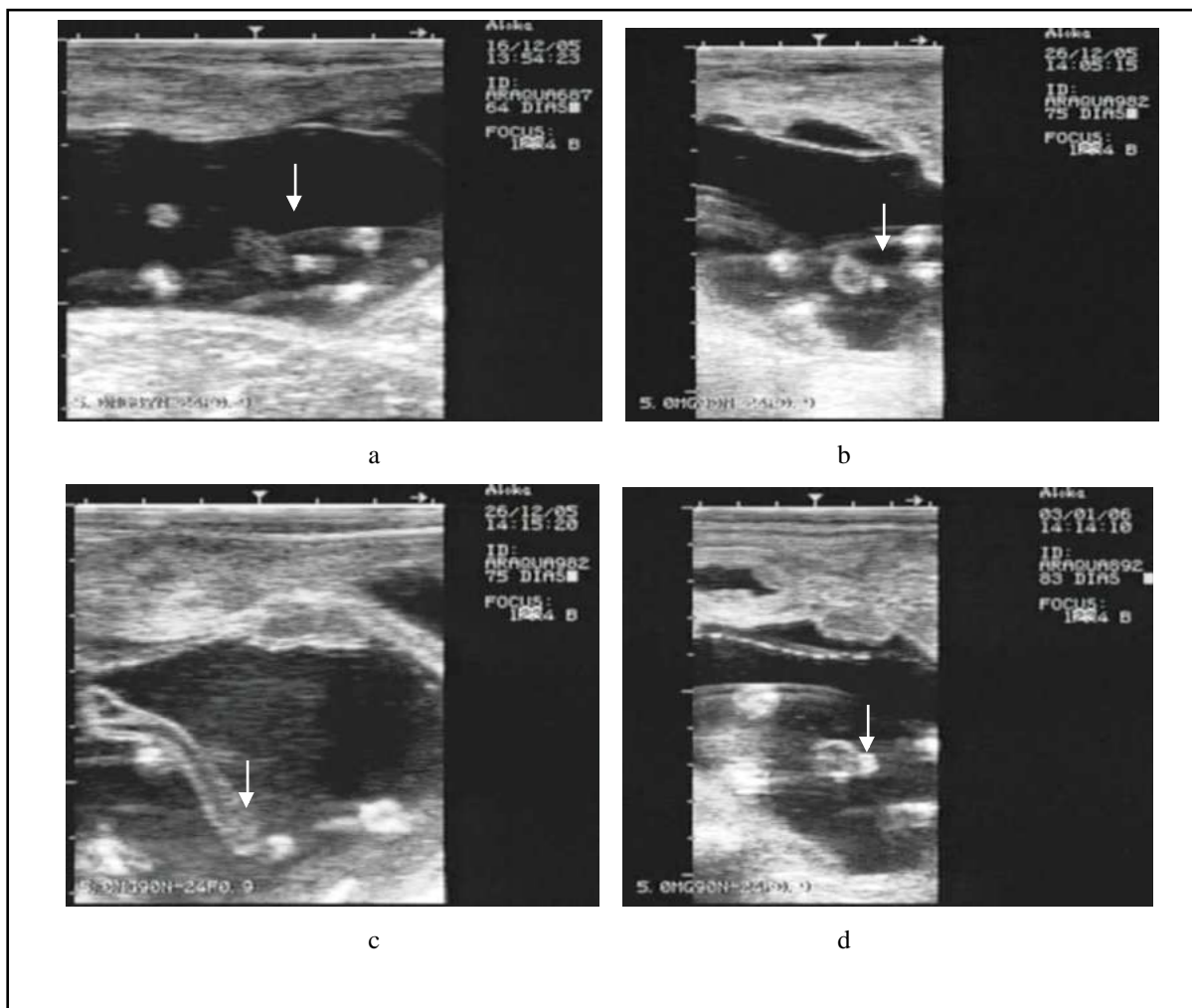
Anexo 9. Ultra-sonografia do útero de uma novilha aos 97 dias de gestação. Figura a: +) diâmetro do cordão umbilical (1.7 cm). Figura b: A seta indica o enovelamento do cordão umbilical.



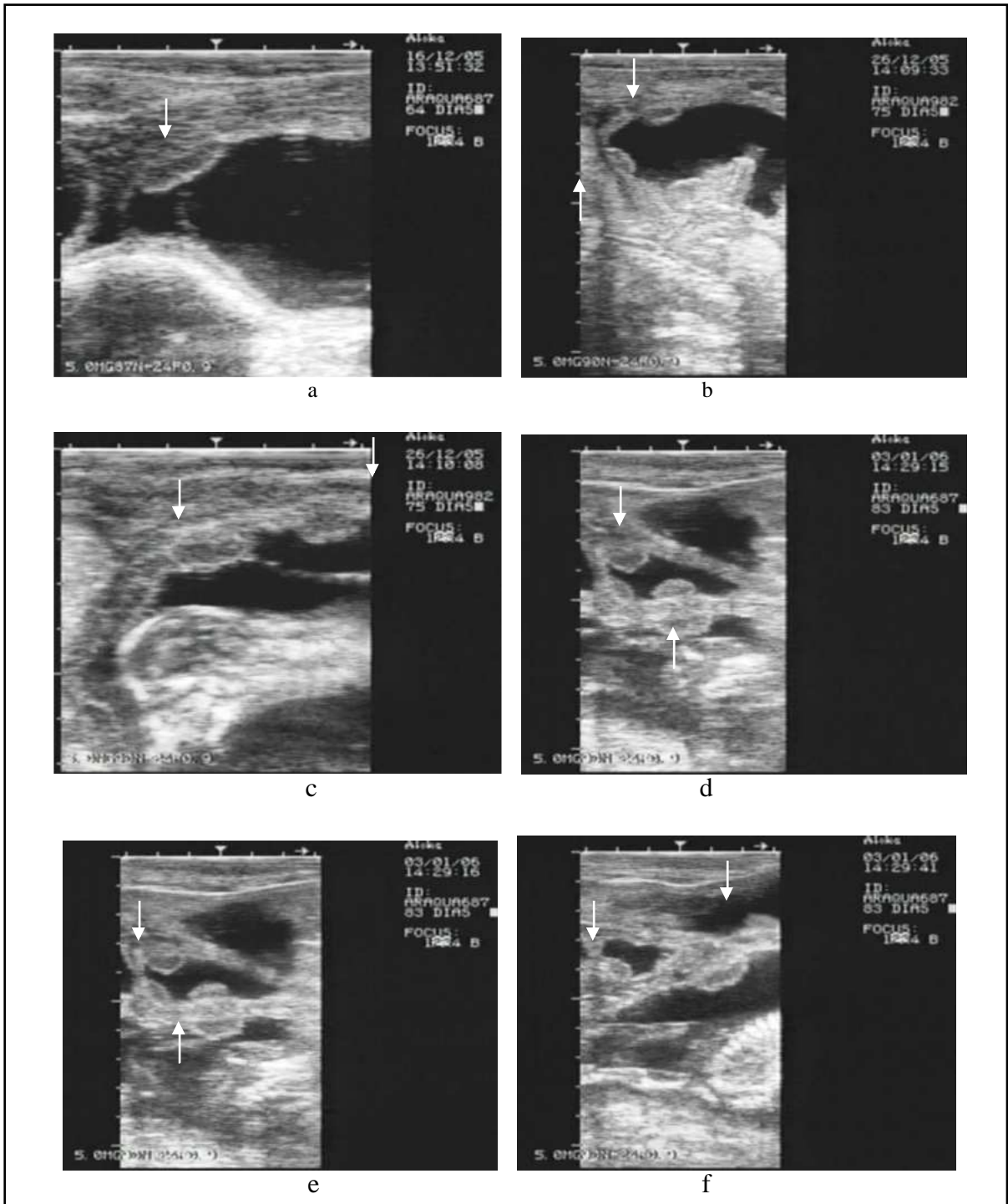
Anexo 10. Ultra-sonografia do útero de uma novilha aos 104 dias de gestação. Figura a: +) diâmetro do cordão umbilical (1.7 cm). Figuras b, c e d: Ilustração do cordão umbilical.



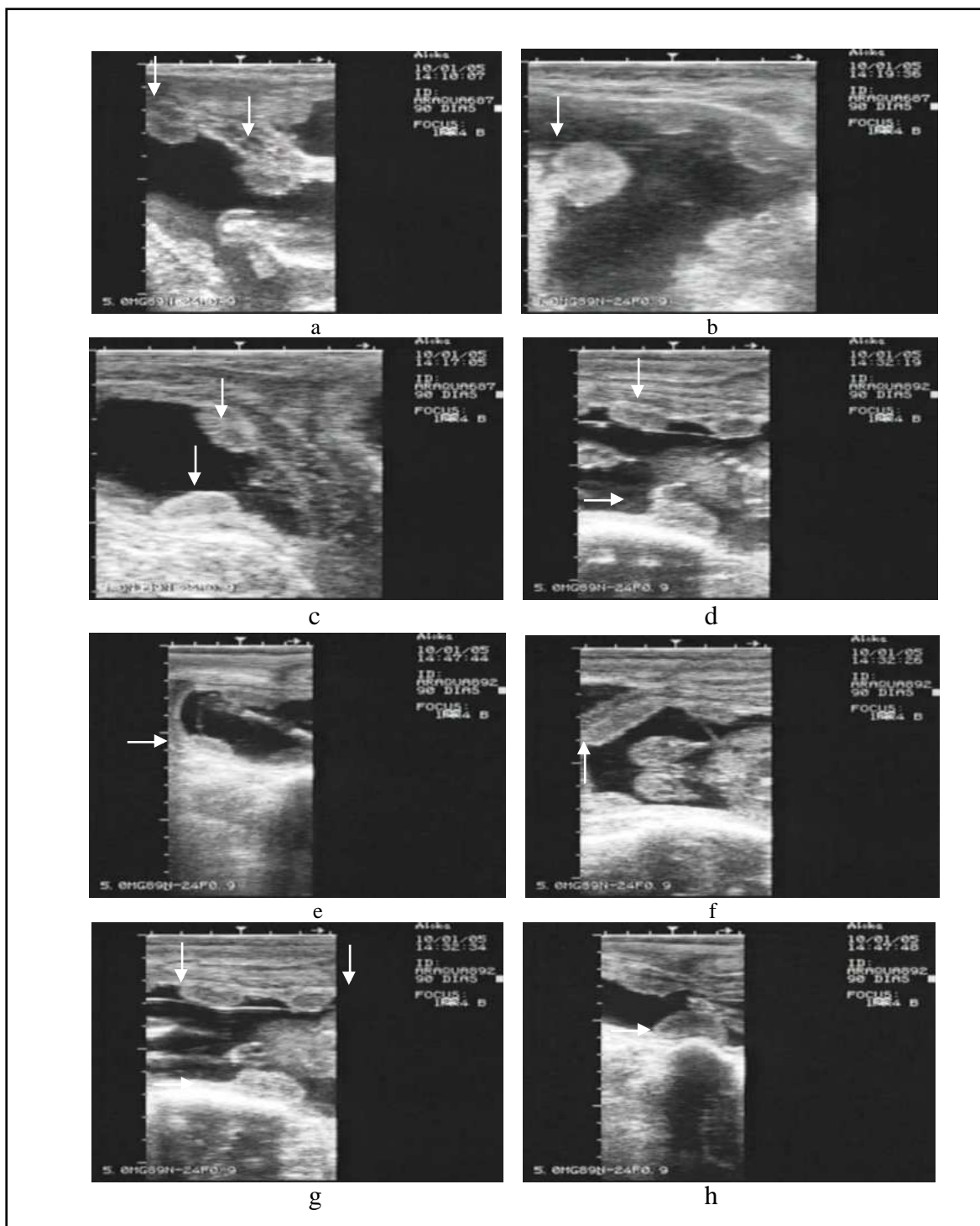
Anexo 11 Imagem ultra-sonográfica do útero de uma novilha dos 64 aos 104 dias de gestação. Figura a: +) Comprimento Inter-orbital aos 64 dias (1.4 cm). Figura b: +) Comprimento Inter-orbital aos 83 dias (2.3 cm). Figura c: +) Comprimento Inter-orbital aos 90 dias (3.5 cm) Figura d: +) Comprimento Inter-orbital aos 104 dias (4.2 cm).



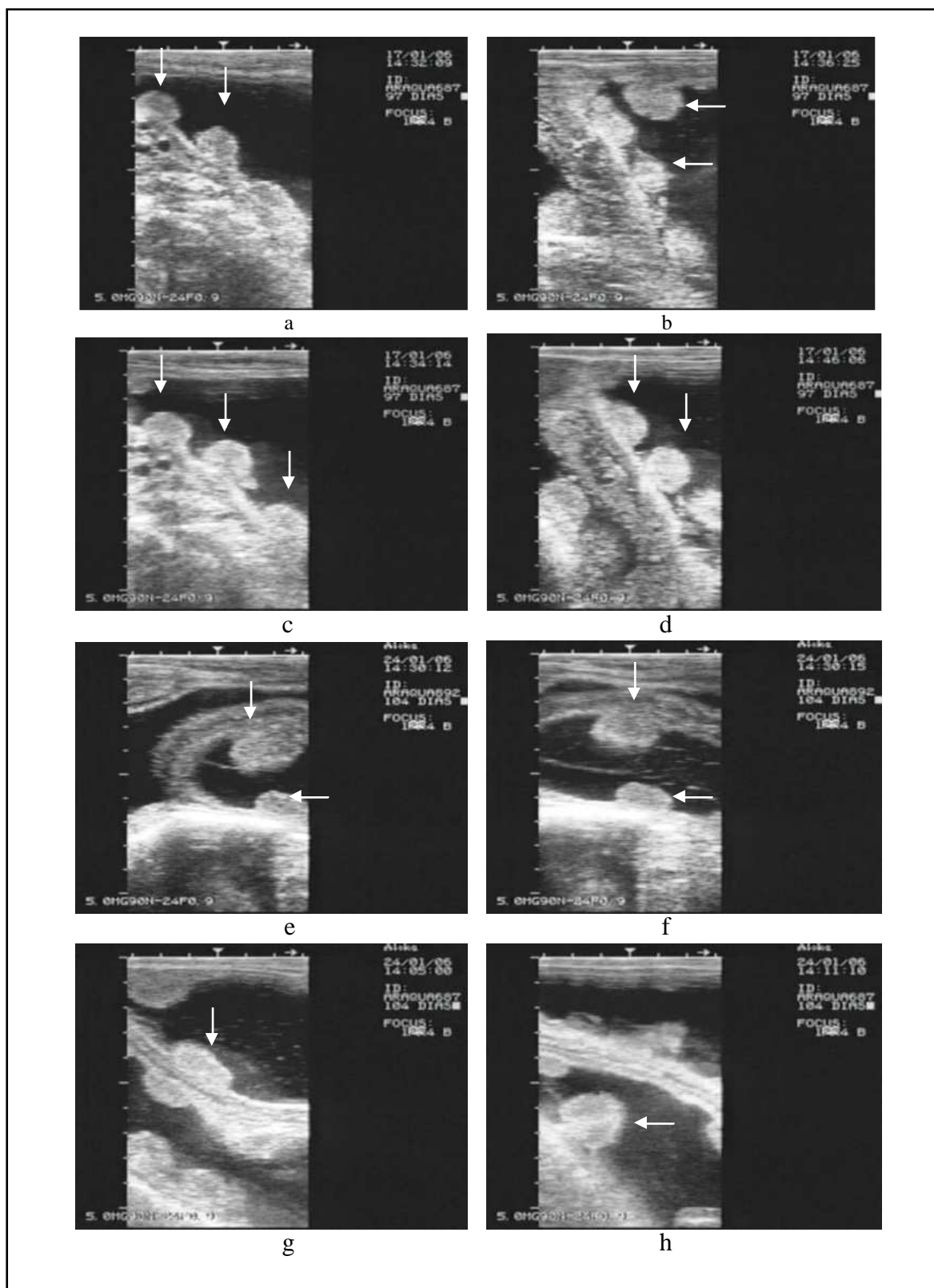
Anexo 12 Acompanhamento do desenvolvimento fetal dos 64 aos 83 dias de gestação. As setas indicam a presença do tubérculo genital próximo ao cordão umbilical aos 64 dias (figura a), aos 74 dias (figuras b e c) e aos 83 dias de gestação (figura d).



Anexo 13. Acompanhamento do desenvolvimento fetal dos 64 aos 83 dias de gestação. As setas indicam os placentônios aos 64 dias (figura a) e aos 83 dias de gestação (figuras b, c, d e f).



Anexo 14. Acompanhamento do desenvolvimento fetal aos 90 dias de gestação. As setas indicam os placentônios.



Anexo15. Acompanhamento do desenvolvimento fetal dos 97 aos 104 dias de gestação. As setas indicam a presença de placentônios aos 97 dias (figuras a, b, c e d) e aos 104 dias de gestação (figuras e, f, g e h).

## REFERÊNCIAS

- ALBERIO, R.; BRERO, A.; MOTLÍK, J.; CREMER, T.; WOLF, E.; KHARTCHENKO, V. Remodeling of donor nuclei, DNA-synthesis, and ploidy of bovine cumulus cell nuclear transfer embryos: effect of activation protocol. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, p. 371-379, 2001.
- ALEXENKO, A. P.; EALY, A. D.; BIXBY, J. A.; ROBERTS, R. M. A classification of interferon- $\tau$ . **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 20, p. 817-822, 2000.
- ALEXENKO, A. P.; LEAMAN, D. W.; LI L.; ROBERTS, R. M. The antiproliferative and antiviral activities of IFN- $\tau$  variants in human cells. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 17, p. 769-779, 1997.
- AVELINO, K. B. **Efeitos de fontes energéticas, antioxidantes e atmosfera gasosa, em meio quimicamente semi-definido no desenvolvimento de embriões bovinos de duas células até blastocisto expandido**. 2000. 70 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.
- BARROS, C. M.; BETTS, J. G.; THATCHER, W. W.; HANSEN, P. J. Possible mechanisms for reduction of circulating concentrations of progesterone by interferon-alpha in cows: effects on hyperthermia, luteal cells, metabolism of progesterone and secretion of LH. **The Journal of Endocrinology**, v. 133, n. 2, p. 175-182, 1992.
- BARTOL, F. F.; ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W.; LEWIS, G. S.; GODKIN, J. D.; THATCHER, W. W. Characterization of proteins produced in vitro by periattachment bovine conceptuses. **Biology Reproduction**, v. 32, p. 681-693, 1985.
- BAZER, F. W.; THATCHER, W. W.; HANSEL, P. J.; MIRANDO, M. A.; OTT, T. L.; PLANTE, C. Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 43, p. 39-47, 1991.
- BAZER, F. W.; MIRANDO, M. A.; OTT, T. L.; HARNEY, J. P.; DUBOIS, D. H.; SCHALUE, T. K.; PONTZER, C. H.; HOSTETLER, C.; JOHNSON, H. M.; OGLE, T. Roles of ovine trophoblast protein-1 and oestradiol/prolactin in the establishment of pregnancy in sheep and pigs. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 4, n. 3, p. 335-340, 1992.



BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; OTT, T. L. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 6, p. 412-420, 1997

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

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; VALENTIM, R.; BERBER, R. C. A.; CARVALHO FILHO, A. F.; MADUREIRA, E. H.; COSTA NETO, W. P. Aumento na taxa de prenhez em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo "ovsynch" com ovulação em tempo fixo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 216, 2000.

BINELLI, M.; DIAZ, T.; HANSEN, T. R.; THATCHER, W. W. Bovine interferon-tau induces phosphorylation and nuclear translocation of stat-1,-2 and -3 in endometrial epithelial cells. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 1, p. 214, 1998.

BINELLI, M.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; ARNOLD, D. R.; SIROIS, J.; HANSEN, T. R.; THATCHER, W. W. Interferon- $\tau$  modulates phorbol ester-induced production of prostaglandin and expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2 from bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 417-424, 2000.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS R.; BARUSELLI P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1451-1463, 2001.

BONI, R.; TOSTI, E.; ROVIELLO, S.; DALE, B. Intracellular communication in vivo and in vitro produced bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1050-1055, 1999.

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

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

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

DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, n. 2, p. 463-469, 1980.

DOMÍNGUEZ, M. M.; LIPTRAP, R. M.; BASRUR, P. K. Fetal fluid steroids and their relationship to gonadal steroid secretion in single and twin bovine fetuses. **Theriogenology**, v. 34, n. 1, p. 57-72, 1990.

DUBY, R. T.; HILL, J. L.; O'CALLAGHAN, D.; OVERSTROM, E. W.; BOLAND, M. P. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. **Theriogenology**, v. 47, p. 332, 1997.

EALY, A. D.; GREEN, J. A.; ALEXENKO, A. P.; KEISLER, D. H.; ROBERTS, R. M. Different ovine interferon-tau genes are not expressed identically and their protein products display different activities. **Biology Reproduction**, v. 58, p. 566-573, 1998.

EALY, A. D.; LARSON, S. F.; LIU, L.; WILKELMANN, G. L.; KUBISH, H. M.; BIXBY, J. A.; ROBERTS, R. M. Polymorphic forms of expressed bovine interferon-τ genes: relative transcript abundance during early placental development, promoter sequences of genes and biological activity of protein products. **Endocrinology**, v. 142, p. 2906-2915, 2001.

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

FAVETTA, L. A.; ROBERT, C.; St. JOHN, E. J.; BETTS, D. H.; KING, W. A. p66shc, but not p53, is involved in early arrest of *in vitro*-produced bovine embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, p. 383-392, 2004.

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

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Ultrasonic morphology of the corpora lutea and central luteal cavities during selection of recipients for embryo transfer. **Reproduction Domestic Animal**, v. 35, p. 113-118, 2000.

GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; BIGGERS, B. G.; GARRET, J. E.; WETTMANN, R. P. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 16, n. 1, p. 11-25, 1988.

GODKIN, J. D.; LIFSEY JR., B. J.; GILLESPIE, B. E. Characterization of bovine conceptus proteins produced during the peri- and postattachment periods of early pregnancy. **Biology Reproduction**, v. 38, n. 3, p. 703-711, 1988.

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

GUILLOMOT, M.; REINAULD, P.; La BONNARDIERE, C.; CHARPIGNY, G. Characterization of conceptus-produced goat interferon tau analysis of its temporal and cellular distribution during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, p. 149-156, 1998.

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

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

HELMER, S. D.; HANSEN, P. J.; ANTHONY, R. V.; THATCHER, W. W.; BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M. Identification of bovine trophoblast protein-1, a secretory protein immunologically related to ovine trophoblast protein-1. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 79, n. 1, p. 83-91, 1987.

HOMA, S. T. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v. 40, p. 122-134, 1995.

HUMBLOT, P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1417-1433, 2001.

JOHNSON, K. M.; ALVAREZ, X.; BORKHSENIUS, O. N.; KUBISH, H. M. Nuclear and cytoplasmic localization of interferon- $\tau$  in in vitro-produced bovine blastocysts. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 46, p. 97-104, 2006.

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**, v. 64, n. 1, p. 79-85, 2003.

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**, v. 49, p. 254-260, 1998.

KUBISCH, H. M.; LARSON, M. A.; KIESLING, D. O. Control of interferon- $\tau$  secretion by in vitro-derived bovine blastocysts during extended culture and outgrowth formation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, p. 390-397, 2001.

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

LAMMING, G. E.; DARWASH, A. O.; BACK, H. L. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, p. 245-252, 1989.

LARSON, M. A.; KUBISCH, H. M. The effects of group size on development and interferon- $\tau$  secretion by in vitro fertilized and cultured bovine blastocysts. **Human Reproduction**, v. 14, p. 2075-2079, 1999.

LARSON, M. A.; KIMURA, K.; KUBISH, H. M.; ROBERTS, R. M. 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 9677-9682, 2001.

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

LEUNG, S. T.; DERECKA, K.; MAN, G. E.; FLINT, A. P. F.; WATHES, D. C. Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 119, p. 25-33, 2000.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; MOREIRA, P. M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1424-1431, 2003.

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

LUKASZEWSKA, L.; HANSEL, W. Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 485-493, 1980.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cow. **Reproduction**, v. 121, p. 175-180, 2001.

MASSIP, A.; MER MILLOD, P.; DINNYES, A. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 10, p. 3004-3011, 1995.

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

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

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

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

MEYER, M. D.; HANSEN, P. J.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; BADINGA, L. Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin F<sub>2α</sub> of cows in response to recombinant interferon-τ. **Journal of Dairy**

**Science**, v. 78, p. 1921-1931, 1995.

NAGAYA, H.; KANAYA, T. Y.; KAKI, H.; TOBITA, Y.; TAKAHASHI, H.; TAKAHASHI, M.; HIRAKO, M.; YOKOMIZO, Y.; INUMARU, S. Establishment of a large-scale purification procedure for purified recombinant bovine interferon-tau produced by a silkworm-baculovirus gene expression system. **The Journal of veterinary medical science**, v. 66, n. 11, p. 1395-401, 2004.

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

OTT, T. L.; YIN, J.; WILLEY, A. A.; KIM, H. T.; GERAMI-NAINI, B.; SPENCER, T. E.; BARTOL, F. F.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Effects of the estrous cycle and early pregnancy on the uterine expression of Mx protein in sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 784-794, 1998.

PARENT, J.; VILLENEUVE, C.; ALEXENKO, A. P.; EALY, A. D.; FORTIER, M. A. Influence of different isoforms of recombinant trophoblastic interferons on prostaglandin production in cultured bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, v. 68, p.1035-1043, 2003.

PAYAS, A. J.; BROADBENT, P. J.; DOLMAN, D. F.; CHRISTIE, W. B. Factors affecting pregnancy rate in embryo transfer recipients with reference to plasma progesterone. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 238, 1989.

PETERS, A. R. Embryo mortality in the cow. **Animal Breeding Abstracts**, v. 4, n. 8, p. 87-598, 1996.

POLLARD, J. W.; LEIBO, S. P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 101-106, 1994.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 62-66, 2003.

RICHARDS, M. W.; SPITZER, J. C.; WARNER, M. B. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 2, p. 300-306, 1986.

- RICHARD, F. J.; SIRARD, M. A. Effects of harvest methods of bovine oocytes co-cultured with follicular hemisections in vitro on nuclear maturation. **Theriogenology**, v. 46, n. 7, p. 1243-1250, 1996.
- RIVERA, R. M.; DAHLGREN, G. M.; CASTRO E PAULA, L. A. de; KENNEDY, R. T.; HANSEN, P. J. Actions of thermal stress in two-cell bovine embryos: oxygen metabolism, glutathione and ATP content, and the time-course of development. **Reproduction**, Cambridge, v. 128, p. 33-42, 2004.
- ROBERTS, R. M. A role for interferons in early pregnancy. **Bioessays**, v. 13, n. 3, p. 121-126, 1991.
- RUBINSTEIN S.; FAMILLETTI P. C.; PETSKA S. Convenient assay for interferons. **Journal Virology**, v. 2, p. 755-758, 1981.
- SANTOS, J. E.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C.; CERRI, R. L. A.; GALVÃO, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, n. 1, p. 513-535, 2004.
- SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. User's guide: statistics. Release 6.03. Cary: SAS, 1988.
- SCOTT, L.; WHITTINGHAM, D. G. Role of facilitative glucose uptake in the glucose-inorganic phosphate-mediated retardation and inhibition of development in different strains of mouse embryos. **Reproduction**, v. 123, p. 691-700, 2002.
- SCHEFE, J. H.; LEHMANN, K. E.; BUSCHMANN, I. R.; UNGER, T.; FUNKE-KAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and novel "gene expression's Ct difference" formula. **Journal of Molecular Medicine**, v. 84, p. 901-910, 2006.
- SINHA, A. E.; PRAZEN, B. J.; FRAGA, C. G.; SYNOVEC, R. E. Valve-based comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection: instrumentation and figures-of-merit. **Journal of Chromatography. A.**, v. 1019, n. 1-2, p. 79-87, 2003.
- SLIMANE, W.; HEYMAN, Y.; LAVERGNE, Y.; HUMBLLOT, P.; RENARD, J. P. Assessing chromosomal abnormalities in two-cell bovine *in vitro* fertilized embryos by

using in situ hybridization with three different cloned probes. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 628-635, 2000.

SMITH, A. K.; BROADBENT, P. J.; DOLMAN, D. F.; GRIMMER, S. P.; DAVIES, D. A.; DOBSON, H. Norgestomet implants, plasma progesterone concentrations and embryo transfer pregnancy rates in cattle. **The Veterinary Record**, v. 139, n. 8, p. 187-191, 1996.

SPELL, A. R.; BEAL, W. E.; CORAH, L. R.; LAMB J. C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cows. **Theriogenology**, v. 56, p. 287-297, 2001.

SPENCER, T. E.; BECKER, W. C.; GEORGE, P.; MIRANDO, M. A.; OGLE, T. F.; BAZER, F. W. Ovine interferon- $\tau$  inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced lutelysis in cyclic ewes. **Endocrinology**, v. 136, p. 4932-4944, 1995.

STOJKOVIC, M.; BUTTNER, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; RIEDL, J.; REICHENBACH, H. D.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; WOLF, E. Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture; comparison of in vivo derived, in vitro produced, nuclear transfer and demi-embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 55, p. 151-162, 1999.

STUBBINGS, R. B.; WALTON, J. S. Relationship between plasma progesterone concentrations and pregnancy rates in cattle receiving either fresh or previously frozen embryos. **Theriogenology**, v. 26, p.145-155, 1986.

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

TAKAHASHI, H.; TAKAHASHI, M.; NAGAYA, H.; HIRAKO, M.; SAWAI, K.; MINAMIHASHI, A.; INUMARU, S.; YOKOMIZO, Y.; GESHI, M.; OKANO, A.; OKUDA, K. Establishment of a specific radioimmunoassay for bovine interferon tau. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1050-1060, 2005.

THATCHER, W. W.; MACMILLAN, K. L.; HANSEN, P. J.; DROST, M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. **Theriogenology**, v. 31, p. 149-164, 1989.



TATCHER, W. W.; BINELLI, M.; BURKE, J.; STAPLES, C. R.; AMBROES, J. D.; COELHO, S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, v. 47, p. 131-140, 1997

URANGA, J. A.; ARECHAGA, J. Cell proliferation is reduced in parthenogenetic mouse embryos at the blastocyst stage: a quantitative study. **The Anatomy Record**, v. 247, p. 243-247, 1997.

VAN DE VELDE, A.; LIU, L.; BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. -T.; YANG, X. Cell allocation and chromosomal complement of parthenogenetic and IVF bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 57-62, 1999.

VAN SOOM, A.; VLAENDEREN, I. V.; MAHMOUDZADEH, A. R.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Comparison rate of *in vitro* fertilized be embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**, v. 38, p. 905-919, 1992.

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

VIUFF, D.; RICKORDS, L.; BERG, H.; HYTEK, P.; AVERY, B.; GREVE, T.; OLSAKER, I.; WILLIAMS, J. L.; CALLESE, H.; THOMSEN, P. D. A high proportion of bovine blastocysts produced *in vitro* are mixploid. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1273-1278, 1999.

WATHES, D. C.; ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The establishment of early pregnancy in cows. **Reproduction Domestic Animal**, v. 33, p. 279-284, 1998.

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

WINKELMANN, G. L.; ROBERTS, R. M.; JAMES PETERSON, A.; ALEXENKO, A. P.; EALY, A. D. Identification of the expressed forms of ovine interferon-tau in the periimplantation conceptus: sequence relationships and comparative biological activities. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1592-1600, 1999.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. Alteration in the relative abundance of gene transcripts in the preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 8-18, 1999.

WRENZYCKI, C.; WELLS, D.; HERRMANN, D.; MILLER, A.; OLIVER, J.; TERVIT, R.; NIEMANN, H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 309-317, 2001

WRIGHT, R. W.; ELLINGTON, J. Morphological and physiological differences between *in vivo* and *in vitro* produced preimplantation embryos from livestock species. **Theriogenology**, v. 44, p. 1167-1189, 1995.

XIAO, C.; LIU, W. J. M.; SIROIS, J.; GOFF, A. K. Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon- $\tau$  in bovine epithelial cells. **Endocrinology**, v. 139, p. 2293-2299, 1998.

YANG, X.; PRESICCE, G. A.; MORAGHAN, L.; JIANG, S.; FOOTE, R. H. Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 41, p. 395-403, 1994.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)