

SYLVIA SANCHES CORTEZZI

**Ativação de genes apoptóticos no bloqueio do
desenvolvimento em embriões bovinos**

SYLVIA SANCHES CORTEZZI

**Ativação de genes apoptóticos no bloqueio do
desenvolvimento em embriões bovinos**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

**Pirassununga - SP
2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

C828a	<p>Cortezzi, Sylvia Sanches Ativação de genes apoptóticos no bloqueio do desenvolvimento em embriões bovinos / Sylvia Sanches Cortezzi. -- Pirassununga, 2009. 146 f. Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Ciências Básicas. Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal. Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.</p> <p>1. Morte celular programada 2. Bovino 3. Oócito 4. Ativação do genoma. I. Título.</p>
-------	---

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha pequena família: minha mãe Eny, minha irmã Sara e minha avó Enid. Obrigada pelo amor, apoio psicológico, emocional e às vezes também financeiro, paciência, preocupação a cada etapa desta tese e por todas as orações em mais esta fase de minha vida. O término deste trabalho representa uma conquista individual e também de vocês. Continuem rezando, pois ainda virão muitos outros objetivos a serem conquistados!

Ao meu pai Sylvio, por estar sempre presente na minha vida, me guiando e protegendo de onde ele está. O tempo diminui a dor, mas não a saudade.

Iniciei esta tese solteira e termino casada...devo isto ao Ronaldo, que se tornou meu namorado, noivo e marido durante este período. Provavelmente é o único engenheiro que entende um pouco deste mundo microscópico de embriões e RNAs, sempre me explicando também um pouco do seu mundo macroscópico de concreto e tijolos. Obrigada pela ajuda na formatação desde o primeiro relatório, pelo compartilhamento das angústias e expectativas, paciência, amor e companheirismo em todas as fases.

À minha nova família, que veio juntamente com o Ronaldo. Acredito que até hoje eles não saibam exatamente com o que eu trabalhei nestes anos, mas sempre entenderam as ausências necessárias. Especialmente ao sobrinho João Vítor, que traz tanta alegria nos meus finais de semana recheados de sorvetes, parques de diversões e brincadeiras em Jaboticabal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proporcionar uma vida cheia de alegrias, família, amigos e saúde.

À FZEA por ter me recebido e permitido a realização desta tese.

À FAPESP, pelo apoio financeiro

Ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, pela orientação, idéias e questionamentos que me auxiliaram nesta caminhada. Obrigada por me aceitar como sua aluna em um momento na qual eu estava sem direção.

Ao Prof. Dr. Lawrence Smith pelas discussões geradas na qualificação, que me guiaram para a melhor compreensão do trabalho.

À Profa. Dra. Cristina Moraes Junta, por todo o auxílio nesta fase, desde o experimento com os arranjos até a qualificação. Obrigada por sempre estar disponível para tirar dúvidas e pelas conversas animadoras.

Ao Prof. Dr. Geraldo Passos (USP - Ribeirão Preto), por ceder seu laboratório para a realização das hibridações.

Às meninas do Laboratório de Imunogenética Molecular (USP - Ribeirão Preto) pela agradável convivência durante minha estadia, incluindo hospedagem quando necessário.

Ao Stephano Spanó Mello (USP – Ribeirão Preto), pela intensa disponibilidade via telefone, email e pessoalmente com a análise dos arranjos.

À Seção de Pós-Graduação da FZEA, especialmente à Conceição, por sua eficiência e auxílio principalmente na fase final deste trabalho, quando eu não pude estar em Pirassununga.

Ao Léo, que entre muitas idas e vindas ao frigorífico, trazia não só os ovários, mas também seu sorriso e alto astral todos os dias.

À Giovana, sempre muito solícita em ajudar em todas as etapas, incluindo nesta fase final devido à minha ausência. Obrigada pelo auxílio com os documentos!

A todos que fazem ou já fizeram parte do LMMD. São tantas pessoas ao longo destes anos que seria injusto citar nomes. Obrigada a todos por me ensinar que diferenças entre as pessoas fazem parte da vida, auxiliar com aspirações de ovários, ensinar procedimentos, discutir idéias e problemas, dividir churrascos e festas, e também auxiliar à distância sempre que necessário! Em especial ao Marcos e ao Moysés, fundamentais em algumas discussões deste trabalho.

Às amigas da FZEA Claudinha e Fran, pela amizade e companhia nas baladas pirassununguenses, e à Estelinha, pela amizade e estadia nos momentos finais.

Ao pessoal da dança, Marcos Mendonça, Marcos, Ursiley e Silvana, pela amizade e descontração não só nas aulas, mas principalmente fora delas. Com vocês eu pude relaxar entre boleros, sambas, tangos, salsas, forrós... Mesmo agora que estamos cada um em uma cidade, vocês sempre serão minha “turma de dança”!

Aos meus amigos de Jaboticabal, antigos ou adquiridos pós-Ronaldo, pelos poucos mas animados finais de semana na terra natal. Em especial à Nádia, Dani (estadias e apoio em Sampa), Raqs Lima, Raqs Costa, Clau Dorigan, Márcia e família.

Aos meus amigos da fase de São José do Rio Preto. Entre os muitos, destaco a Lê Vidotto (e seus pais) e a Lú Bizari, sempre disponibilizando suas casas para minha estadia. À Cássia e seus pais pelo carinho e amizade. Ao Eduardão, ao Adriano, ao Alfredo e ao Amílcar, que ficam na torcida de longe, via internet, me dão os puxões de orelha necessários e fazem minha vida mais feliz.

Ao pessoal da Associação Instituto Sapientiae – Clínica Fertility, por acreditarem na minha capacidade profissional.

E a todos que contribuíram pessoalmente ou profissionalmente para o que eu sou hoje!

RESUMO

CORTEZZI, S.S. **Ativação de genes apoptóticos no bloqueio do desenvolvimento em embriões bovinos.** 2009. 146f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

A transição materno-embriônica é um fenômeno complexo caracterizado pela iniciação da transcrição no embrião e a substituição do mRNA materno pelo mRNA embrionário. O mRNA e as proteínas estocadas no oócito são utilizados nas primeiras clivagens e, posteriormente, o embrião deve iniciar a transcrição dos genes necessários ao seu desenvolvimento, que ocorre no estágio de oito células em embriões bovinos. Nesta etapa, podem ser observados embriões competentes a continuar o desenvolvimento, enquanto embriões incompetentes sofrem bloqueio. Pelo fato do bloqueio ocorrer na fase de ativação do genoma embrionário, formulou-se a hipótese de que o bloqueio estaria associado a genes transcritos neste momento, contrariamente à hipótese mais aceita de bloqueio passivo. O objetivo deste trabalho foi de identificar, categorizar e avaliar transcritos diferencialmente expressos entre embriões bovinos de desenvolvimento rápido e lento, além de elucidar possíveis vias de sinalização de morte ou sobrevivência celular. Para isso, foi feita uma hibridação em membrana de macro arranjo contendo genes humanos relacionados a ciclo celular, hibridada com aRNA marcado radioativamente oriundo de embriões bovinos produzidos *in vitro* de acordo com sua velocidade de desenvolvimento, seguido por RT-PCR e análise de vias de sinalização para validação da hibridação. A média de similaridade entre estes genes humanos e bovinos de 89,3%. Pelas membranas de macro arranjos foram identificados 120 genes com modulação diferencial entre embriões lentos e rápidos, sendo 100 genes com regulação superior nos embriões lentos. Entre os genes com modulação positiva nos embriões rápidos, 40% foram primariamente identificados como ligantes a proteínas e 25% têm atividade catalítica, com resultados similares no grupo de genes com modulação positiva nos embriões lentos. Por um lado, as diferenças de transcrição entre embriões de desenvolvimento rápido e lento não foram confirmadas pelo RT-PCR. Mas os genes diferencialmente modulados estão associados e constitutivamente presentes em algumas vias de sinalização para morte celular. Os resultados sugerem que a ativação do genoma embrionário é necessária para a sinalização de vias de sobrevivência ou morte celular programada. Assim, o bloqueio do desenvolvimento não é um processo passivo, mas sim um processo ativo de transcrição de genes, ativando tanto a cascata de sobrevivência quanto a cascata de morte em embriões com baixo potencial de desenvolvimento.

Palavras chave: morte celular programada, bovino, oócito, ativação do genoma

ABSTRACT

CORTEZZI, S.S. **Activation of apoptotic genes at developmental block in bovine embryo development.** 2009. 146f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

Maternal-zygotic transition is a complex phenomenon characterized by the initiation of transcription in the embryo and the transition of maternal mRNA with embryonic mRNA. It is believed that the mRNAs and proteins synthesized by the oocyte during its growth and final maturation allow the zygote to develop during the early stages of embryo development up to the 8 cell-stage, the moment when the bovine embryo acquires transcriptional competence. Competent embryos are able to develop until blastocyst, while incompetent embryos block. Since the blockage occurs during embryo genome activation, we developed the hypothesis that gene transcription in incompetent embryos is associated with the blockage, instead of passive blockage. The aim of this work was to identify, categorize and analyze gene expression differences between fast cleavage and slow cleavage embryos, and discover possible signaling pathways to cell death or cell survival. We used a macroarray membrane spotted with human genes related to cell cycle and hybridized with a radioactive labeled aRNA from fast or slow *in vitro* produced embryos. Real-time PCR and signaling pathways analysis were designed for further validation of the array. The mean similarity between human and bovine genes was 89,3%. According to the array membranes, it was possible to identify 120 genes differentially expressed between slow and fast cleavage embryos. Hence, the majority of the genes were more expressed in slow embryos (100 genes versus 20 genes in fast group). Among genes more expressed at fast embryos, 40% were identified as protein binding and 25% have catalytic activity, with similar results in slow embryos. In one hand, differences between fast and slow embryos transcripts were not confirmed by real-time PCR analysis. But on the other hand, the differentially expressed genes are somehow related to and constitutively present in some recognized death pathways. Together, these results presented herein suggest that embryonic genome activation is necessary for survival or cell death signaling. Moreover, developmental block is not a passive pathway, but rather a very active transcriptional pathway, leading to activation of cell survival genes prior to genes related to death in slow-developing embryos.

Key words: programmed cell death, cattle, oocyte, genome activation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Fases do desenvolvimento embrionário bovino. Maturação: da VG até MII, com extrusão do 1º corpúsculo polar. Fecundação: formação do zigoto e extrusão do 2º corpúsculo polar. Cultivo: clivagens e divisão dos blastômeros, formação da mórula e diferenciação em massa celular interna e trofotoderma no blastocisto. AGE ocorre entre 8 e 16 células. Fonte: adaptado de Badr et al., 2007.....25
- Figura 2.** Ativação do genoma embrionário menor e maior durante os eventos do desenvolvimento embrionário em bovinos. A AGE maior ocorre no estágio de 8 a 16 células, mas há atividade transcricional de origem embrionária menor no estágio de 1 a 2 células. Portanto, a AGE ocorre em múltiplas etapas durante o período de pré-implantação em bovinos. Fonte: adaptado de Badr et al., 2007.....27
- Figura 3.** Depleção dos estoques de RNA materno e aumento de transcrição do RNA embrionário associados à transição materno-zigótica no estágio de 8 células em embriões bovinos. Fonte: adaptado de Niemann; Carnwath, Kues, 2007.....28
- Figura 4.** Algumas funções da morte celular programada no desenvolvimento animal. Fonte: adaptado de Jacobson, Weill, Raff, 2007.....33
- Figura 5.** Esquema das vias extrínseca e intrínseca da MCP. A via extrínseca é disparada pela ligação do ligante ao receptor. A molécula adaptadora liga-se ao domínio de morte citoplasmático do receptor, iniciando a ativação das caspases iniciadoras, que resultam na ativação das caspases efetoras. A via intrínseca é disparada após um dano mitocondrial, levando à liberação do citocromo c, com subsequente formação do apoptossomo. (citocromo c + Apaf-1 + pró-caspase 9). Após ativação da caspase 9, a via intrínseca converge com a extrínseca, no momento de ativação das caspases efetoras, levando à MCP. Fonte: adaptado de Hajra, Liu, 2004.34
- Figura 6.** Ligação membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 à membrana mitocondrial, permitindo a liberação de íons cálcio, do citocromo c, das proteínas Smac/DIABLO, Omi/Htra2, do fator AIF e da Endo G ao citoplasma, onde estas irão contribuir à sinalização da MCP. Fonte: adaptado de Danial, Korsmeyer, 2004. 35
- Figura 7.** Via extrínseca da MCP com ligação de ligantes aos receptores TNFR-1, Fas e TRAIL na membrana celular. Os receptores transmitem os sinais por domínios DD, DED e CARD, que ativam a sinalização da cascata de caspases, além de outras moléculas, que culminam com a ativação de caspases efetoras, levando à MCP. Fonte: adaptado de Danial, Korsmeyer, 2004. 36
- Figura 8.** Interações entre membros da família Bcl-2. Estão representadas as três principais subfamílias de Bcl-2: pró-apoptóticos (quadrados laranjas), anti-apoptóticos (círculos verdes) e

formadores de canais pró-apoptóticos (formas ovais azuis). As alterações de coloração mostram as afinidades de ligação entre os membros. Fonte: adaptado de Jurisicova, Acton, 2004.....	38.
Figura 9. Esquema da confecção de membranas de macro arranjo e preparo de sondas radioativas para análise dos transcritos. Fonte: adaptado de Passos, Nguyen, Jordan, 2000.	41
Figura 10. Ilustração das diferentes etapas do processo de produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos. A – Aspiração dos folículos ovarianos; B – Líquido folicular; C – Oócitos selecionados; D – Preparação do gradiente de Percoll; E – Seleção dos espermatozóides viáveis; F- Fecundação <i>in vitro</i> ; G - Embriões no estágio de 8 células.....	47
Figura 11. Passos para a produção de cDNA dupla fita e amplificação do aRNA em três etapas de amplificação.	51
Figura 12. Deposição dos clones em membranas de <i>nylon</i> pelo equipamento <i>Generation III MicroArray Spotter</i>	53
Figura 13. Membrana de arranjos de cDNA hibridada com sonda oligo-vetor. Cada ponto equivale a um clone, sendo que a coluna da direita é réplica da coluna da esquerda, tendo sido consideradas como repetições neste experimento.....	54
Figura 14. Membrana de arranjos de cDNA hibridada com sonda marcada. Em A, membrana sem as grades de spotagem; em B, membrana com as grades de spotagem (pontos em azul). Os pontos em verde representam os controles de qualidade da membrana e os pontos em amarelo são pontos excluídos em análise visual devido ao <i>background</i>	57
Figura 15. Esquema do experimento: os embriões foram produzidos e separados nos grupos R8 e L8, sendo destinados à extração de RNA mensageiro seguida de amplificação do RNA e hibridação em membranas de arranjo ou destinados à extração de RNA total seguida de amplificação dos fragmentos de interesse por PCR em Tempo Real.	66
Figura 16. Diagnóstico dos resultados após filtragem e normalização em embriões do grupo L8, em todas as replicatas.	72
Figura 17. Diagnóstico dos resultados após filtragem e normalização em embriões do grupo L8, excluídos os valores máximos, em todas as replicatas.	72
Figura 18. Diagnóstico dos resultados após filtragem e normalização em embriões do grupo R8, em todas as replicatas.	73
Figura 19. Diagnóstico dos resultados após filtragem e normalização em embriões do grupo R8, excluídos os valores máximos, em todas as replicatas.....	73
Figura 20. Gráfico de dispersão da diferença relativa observada $D(i)$ e esperada $D(e)$. As linhas	

tracejadas são cortes a uma distância Δ da linha contínua.....	74
Figura 21. Agrupamento hierárquico (HCL) dos resultados obtidos nos experimentos (colunas), visualizando-se o padrão de regulação gênica (linhas) apresentados pelos embriões do grupo L8 e R8. Representação dos 20 genes com modulação inferior no grupo L8 em relação ao grupo R8. O valor da regulação normalizada para cada gene (de acordo com a escala acima) é representado pelas cores. Vermelho indica níveis de regulação maiores que a mediana e verde indica níveis de regulação menores que a mediana. Cinza indica valores excluídos durante a normalização. Preto indica valores sem modificação na modulação gênica.	80
Figura 22. Agrupamento hierárquico (HCL) dos resultados obtidos em embriões do grupo L8 e R8, em cada replicata. Aqui estão representados os 100 genes com modulação significativamente superior no grupo L8 em relação ao grupo R8. Vermelho indica níveis de regulação maiores que a mediana e verde indica níveis de regulação menores que a mediana. Cinza indica valores excluídos durante a normalização. Preto indica valores sem modificação na modulação gênica.	81
Figura 23. Distribuição das funções moleculares dos genes regulados negativamente em embriões L8 em relação a R8.....	83
Figura 24. Distribuição das funções moleculares dos genes regulados positivamente em embriões L8 em relação a R8.....	86
Figura 25. Gráfico de dispersão da diferença relativa observada e esperada, indicando a posição dos genes escolhidos para validação por PCR em Tempo Real.	93
Figura 26. Fotografia do gel de agarose 1% para avaliação de amplificação do produto de PCR dos genes SOCS1, em duplicata (porção superior do gel) e CCL28, em duplicata (porção inferior do gel). Linha 1. SOCS1 – 50 nM - 58°C. Linha 2. SOCS1 – 50 nM - 60°C. Linha 3. SOCS1 – 250 nM - 58°C. Linha 4. SOCS1 – 250 nM - 60°C. Linha 5. CCL28 – 50 nM - 58°C. Linha 6. CCL28 – 50 nM - 60°C. Linha 7. CCL28 – 250 nM - 58°C. Linha 8. CCL28 – 250 nM - 60°C. Marcador de 100 pb.....	95
Figura 27. Curva de amplificação em Tempo Real para o gene GAPDH em teste de concentração de <i>primer</i>	96
Figura 28. Curva de Dissociação para avaliação da especificidade da amplificação dos <i>primers</i> SFRS11(A), SOCS1 (B), CCL28 (C) e COL1A2 (D).....	96
Figura 29. Curva de Dissociação para avaliação da especificidade da amplificação dos <i>primers</i> BIRC6 (E), OPCML (F), TAF1B (G) e Survivina (H).....	97
Figura 30. Regulação relativa dos transcritos (rER) dos genes SFRS11, SOCS1, COL1A2, BIRC6, OPCML, TAF1B e Survivina nos embriões do grupo de desenvolvimento rápido (R8) e lento (L8).	101

Figura 31. Rede de regulação que envolve os genes cuja função protéica é associada à MCP. Os símbolos com um círculo rosa na porção direita superior indicam os genes diferencialmente modulados em embriões L8 identificados no arranjo. Os símbolos com um quadrado vermelho na porção direita superior indicam os genes diferencialmente modulados detectados em embriões bovinos validados em outros experimentos. A legenda das figuras pode ser encontrada no anexo B. Conforme descrito anteriormente, o embrião de baixo potencial de desenvolvimento e alto potencial de bloqueio possui vários mRNAs de genes que regulam o processo de MCP. A presença de BIRC6, dos genes envolvidos na sinalização de PI3K (FIGUEIREDO, 2005) e da Survivina (PARK et al., 2007) mais modulados nestes embriões pode ser um indicativo de uma tentativa do embrião de se proteger contra a morte celular programada.....113

Figura 32. Mapa de regulação gênica associado à sinalização para sobrevivência celular. Os símbolos com barra vermelha na porção direita superior indicam os genes diferencialmente modulados em embriões L8 identificados no arranjo. A legenda das figuras pode ser encontrada no anexo B. O sistema JAK2 – STAT3 aliado a SOCS1, que foi identificado como altamente modulado, podem sugerir um sistema de regulação da sobrevivência via p120GAP – PI3K – ERK e via c-Myc – Bcl-2.117

Figura 33. Rede de regulação que envolve os genes cuja função protéica é associada MCP e sobrevivência celular. Os símbolos com um círculo rosa na porção direita superior indicam os genes diferencialmente modulados em embriões L8 identificados no arranjo. Os símbolos com um quadrado vermelho na porção direita superior indicam os genes diferencialmente modulados detectados em embriões bovinos validados em outros experimentos. A legenda das figuras pode ser encontrada no anexo B. Conforme descrito anteriormente, o embrião de baixo potencial de desenvolvimento e alto potencial de bloqueio possui vários mRNAs de genes que regulam o processo de MCP. A presença de COL1A2, DEK, TIA-1 regulando a sinalização de sobrevivência do NF- κ B, dos genes envolvidos na sinalização de PI3K (FIGUEIREDO, 2005) e da Survivina (PARK et al., 2007) mais modulados nestes embriões pode ser um indicativo de uma tentativa do embrião de se proteger contra a morte celular programada.....122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes escolhidos para validação em PCR Tempo Real.....	61
Tabela 2. Seqüências e tamanho dos fragmentos amplificados (em pares de bases - pb) pelos oligonucleotídeos senso (<i>forward –F</i>) e antisenso (<i>reverse – R</i>).....	62
Tabela 3. Genes com modulação negativa no grupo L8 em relação ao grupo R8.....	75
Tabela 4. Genes com modulação positiva no grupo L8 em relação ao grupo R8.....	76
Tabela 5. Categorização dos genes menos modulados em L8 em relação a R8.....	83
Tabela 6. Categorização dos genes mais modulados em L8 em relação a R8.....	85
Tabela 7. Similaridade das seqüências entre o genoma humano e bovino nos genes regulados negativamente no grupo L8.....	88
Tabela 8. Similaridade das seqüências entre o genoma humano e bovino nos genes regulados positivamente em L8.....	89
Tabela 9. Média de CTs não normalizados dos embriões dos grupos R8 e L8 para todos os pares de oligonucleotídeos analisados.....	98
Tabela 10. Valores de CTs médios para os aRNAs amplificados em uma ou duas etapas nos grupos R8 e L8.....	98
Tabela 11. Eficiência média da reação e desvio padrão da eficiência para os genes analisados.....	100
Tabela 12. Valores de rER médios dos transcritos e desvio-padrão para cada grupo de embrião (R8 e L8) e valores de p, considerando significativo $p < 0,05$	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ^{33}P – fósforo isótopo 33
- A80 – oligonucleotídeo com uma seqüência de 80 adeninas
- AGE – ativação do genoma embrionário
- AIF – fator indutor de apoptose
- AKAP13/LBC - *A kinase PRKA anchor protein 13*
- AP-1 - activator protein 1
- Apaf-1 - *Apoptotic protease-activating factor 1*
- Akt/Pkb – proteína quinase B
- aRNA – RNA antisenso
- ATF5 - *activating transcription factor 5*
- ATP – adenosina tri-fosfato
- ATR - *ataxia-telangiectasia mutated and Rad3-related*
- ATRIP – proteína de interação a ATR
- Bad – *Bcl-2-antagonist of cell death*
- BAT3 - *HLA-B associated transcript 3*
- Bax – *Bcl-2-associated X protein*
- Bcl-2 - *B cell leukemia/lymphoma 2*
- BIR - *baculoviral IAP repeat*
- BIRC 5 - *baculoviral IAP repeat-containing 5/survivin*
- BIRC 6 - *baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon)*
- BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*
- BRM – subunidade ATPase do complexo SWI/SNF de remodelação da cromatina
- BSA – albumina sérica bovina
- °C – graus Celsius
- c-Abl - *V-abl Abelson murine leukemia oncogene 1*
- c-Myc – *myelocytomatosis viral oncogene*
- CARD – domínio intracelular de recrutamento de caspase de um receptor
- CCL 28 - *chemokine (C-C motif) ligand 28*
- CDC14A - *cell division cycle 14 homolog A S. cerevisiae*
- CDKs- quinases inibidoras de ciclinas
- cDNA – DNA complementar
- CIV – cultivo *in vitro* de embriões
- CKIs- inibidores de CDKs
- cm - centímetros

CO₂ – gás carbônico
 COC – complexo cumulus-oócito
 COL 1A2 - colágeno tipo I alfa 2
 cpm – cintilações por minuto
 CT – ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de fluorescência
 CTP – citosina tri-fosfato
 DAXX 6 – proteína associada à morte 6
 DD – domínio intracelular de morte de um receptor
 DD-PCR – *Differential Display PCR*
 DED - domínio intracelular efetor de morte de um receptor
 DEK - D6S231E DEK/NUP214 *fusion gene*
 DEPC – dietil pirocarbonato
 DISC – complexo de sinalização indutor de morte
 DNA – ácido desoxirribonucléico
 E – eficiência da reação de PCR
 E2F – fator de transcrição regulado por Rb
 EASE - *Expression Analysis Systematic Explorer*
 EGF – fator de crescimento epidérmico
 Elk1 – membro da família ETS de oncogenes
 Endo G – endonuclease G
 Erk - *extracellular signal regulates kinase*
 Fas – *TNF receptor superfamily, member 6*
 FasR - receptor do Fas
 FGFR2 - receptor do fator de crescimento de fibroblastos 2
 FIV – fecundação *in vitro*
 FRD – taxa de descobertas falsas
 FSH – hormônio folículo estimulante
 G – gauge
 Gadd – *growth arrest and the DNA damage inducible gene*
 GAPs - *GTPase activating proteins*
 GAPDH – gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
 GRB - *growth factor receptor bound*
 GRB14 - *growth factor receptor bound protein 14*
 GTP – guanina tri-fosfato
 H2A.z – histona 2A, membro Z
 HCL – agrupamento hierárquico de genes
 HIVEP2 - *Human immunodeficiency vírus type 1 enhancer-binding protein 2*

Hpi – horas pós inseminação
IAP – inibidores de morte celular programada
IFN – interferon
IFN- γ - interferon gama
IGF - fator de crescimento semelhante à insulina
I κ B - proteínas inibidoras de κ B
IKK - I κ B quinase
IMAGE - Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression Consortium's
IR – receptor de insulina
IRS - substratos dos receptores de insulina
ITM2B - proteína integral de membrana 2B
Jaks - quinases citoplasmáticas Janus
JNKs - *c-Jun N-terminal kinases*
kD- quilo dalton
KLF – família dos fatores de transcrição *Krüppel-like*
KLF5 – Fator de transcrição *Krüppel-like 5*
L8 – embriões bovinos com desenvolvimento lento até o estágio de 8 células
LH – hormônio luteinizante
M – molar
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno
MAPK8IP2 - *Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2*
MAP3K2 - *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2*
MCP – morte celular programada
MEK - *MAPK/ERK kinase*
MEKK - *MAPK/ERK kinase kinase*
MIV – maturação *in vitro*
Miz-1 – *Myc-interacting zinc finger protein-1*
mL - mililitro
mm - milímetros
MPF - fator promotor de maturação
MPK - proteína quinase ativada por mitógenos
mRNA – RNA mensageiro
MYT1 – fator de transcrição da mielina
MYT1L - *Myelin transcription factor 1-like*
 μ g – micro grama
 μ L – micro litro
 μ M – micro molar

N – normal

NDPKA - *Nucleoside diphosphate kinase A*

NF- κ B – Fator nuclear - *kappaB*

ng – nano grama

nM – nano molar

Omi/HtrA2 - *HtrA serine peptidase 2*

OPCML - *Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like*

p120GAP - *GTPase activating protein 120*

p53 –proteína de 53 kD

PARP-1 - *Poly ADP-Ribose polymerase*

Pb – pares de bases

PBS – salina tamponada com fosfato

PCR – reação em cadeia da polimerase

PDCD4 - *programmed cell death 4*

PDGF - *platelet derived growth factor*

PDK1 - *3-phosphoinositide dependent protein kinase-1*

pg – picogramas

PHE - penicilamina, hipotaurina e epinefrina

Pidd – *leucine-rich repeats and death domain containing*

PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase

PIV – produção *in vitro* de embriões

PKA - proteína quinase A

PVP – polivinilpirrolidona

R8 – embriões bovinos com desenvolvimento rápido até o estágio de 8 células

Raf - *RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*

Ras - *RAS family of small GTPases*

RASA1 - *RAS p21 protein activator 1*

rER – razão de expressão relativa

RNA – ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

rRNA – RNA ribossômico

RT-PCR – PCR em Tempo Real

SAM – análise de significância para arranjos

SDHA - *Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit A*

SDS – dodecil sulfato de sódio

SET - *SET translocation myeloid leukemia associated*

SFB – soro fetal bovino

SFRS 11 - *Splicing factor, arginine/serine-rich 11*
SH – membrana de arranjo de seleção humana
SL1 – *selectivity factor 1*
Smac/DIABLO – *second mitochondria derived activator of caspase*
SOCS 1 - *Suppressor of cytokine signaling 1*
SOURCE - *Stanford On Line Universal resource for Clones and ESTs*
SPOP - *speckle-type POZ protein*
SSC – solução salina com citrato de sódio
STAT – transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TAF - *TBP associated factors*
TAF 1B - *TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, B, 63kDa*
TALP - *Tyrode's albumin lactate pyruvate*
TBP - *TATA binding-protein*
TGF- β 1 – *transforming growth factor beta 1*
TIA-1 - *T-cell restricted intracellular antigen-1*
TIAR – proteína relacionada a TIA-1
TIGR – *The Institute for Genomic Research*
TLR - receptores *Toll-like*
T_m – temperatura de fusão ou dissociação
TMZ – transição materno-zigótica
TNF – fator de necrose tumoral
TNFR1 – receptor do fator de necrose tumoral 1
TOPBP1 - *topoisomerase DNA II binding protein 1*
TOP2 beta - *DNA topoisomerase II, beta isozyme*
TRAIL – ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
TUNEL – *Terminal deoxynucleotil transferase Uracil Nick End Labeling*
UNG – uracil-N-glicosilase
UTP – uracila tri-fosfato
UTR – seqüência não traduzida
UV – ultravioleta
VG – vesícula germinativa
WNT10A - *Wingless-type MMTV integration site family, member 10A*
XIAP – *X linked IAP*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Período pré-implantação em bovinos	22
2.2	Ativação do genoma embrionário (AGE) ou Transição Materno Zigótica (TMZ)	25
2.3	Bloqueio do desenvolvimento embrionário	29
2.4	Morte Celular: Necrose/Oncose e Apoptose	31
2.5	Metodologias de estudo na embriogênese	40
3.	HIPÓTESE	43
4.	OBJETIVO	44
5.	MATERIAL E MÉTODOS	45
5.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos (PIV)	45
5.2	Análise da regulação gênica por hibridação em membranas de arranjo	48
5.2.1	Extração do RNA mensageiro (mRNA)	48
5.2.2	Amplificação do RNA antisense (aRNA)	49
5.2.3	Hibridação das membranas (<i>macroarrays</i>)	52
5.3	Análise da modulação gênica por amplificação de genes de interesse	60
5.4	Construção de mapas de regulação gênica (<i>pathways</i>)	65
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
6.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	67
6.2	Extração do mRNA e amplificação do aRNA	67
6.3	Hibridação das membranas (<i>macroarrays</i>)	69
6.4	Análise dos resultados da hibridação	70
6.5	Validação dos resultados do arranjo	93
6.5.1	Amplificação dos genes selecionados por PCR em Tempo Real (RT-PCR)	94
6.5.2	Construção de mapas de regulação gênica (<i>pathways</i>)	105
7.	CONCLUSÕES	123
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
	ANEXOS	145

1. INTRODUÇÃO

Em mamíferos, o período de pré-implantação compreende a formação do zigoto, a ativação do genoma embrionário (AGE), a compactação e a polarização do epitélio embrionário, a diferenciação de mórula em blastocisto até a implantação do embrião no epitélio uterino (JEONG et al., 2006; WRENZYCKI et al., 2005). O potencial de desenvolvimento até o estágio de blastocisto está associado a características de qualidade inerentes ao oócito e à interação deste embrião com meios e ambientes de cultivo (BREVINI et al., 2002; GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; GUTIÉRREZ-ADAN et al., 2004; HYTTEL et al., 2001; LONERGAN et al., 2003; MEIRELLES et al., 2004; MOUROT et al., 2006; NIEMANN; WRENZYCKI, 2000; RIZOS et al., 2002).

Neste período, estas intensas alterações morfológicas e fisiológicas são acompanhadas por mudanças no padrão de expressão gênica. A regulação da transcrição está estritamente relacionada à estrutura cromatínica e ao conteúdo macromolecular do citoplasma. As acetilases de histonas, desacetilases de histonas e as metiltransferases são capazes de se associarem ao DNA e regularem a disponibilidade e a especificidade da cromatina para a transcrição, alterando o padrão epigenético dos embriões (BETTEGOWDA; LEE; SMITH, 2008; KANKA, 2003; LATHAM; SCHULTZ, 2001; ZHENG et al., 2004). O citoplasma deve estar provido de fatores de transcrição e da maquinaria para a ocorrência da mesma (KANKA, 2003; SCHIER, 2007).

Assim, os RNAs mensageiros (mRNA) e as proteínas estocadas durante o período de crescimento e maturação oocitária são utilizados nas primeiras clivagens do embrião, até o momento da AGE, quando este deve tornar-se responsável pela transcrição dos genes necessários ao seu desenvolvimento (BADR et al., 2006; BETTEGOWDA; LEE; SMITH, 2008; KANKA, 2003; LI; CUI; KIM, 2006; MASSICOTTE et al., 2006). A AGE é de suma importância para a substituição gradual dos transcritos específicos do oócitos pelos transcritos embrionários, alterando substancialmente o padrão e o perfil de expressão gênica nestes embriões (ADJAYE et al., 2007; BREVINI et al.; 2002; KANKA, 2003; LI; CUI; KIM, 2006; MEMILI;FIRST, 1998). O citoplasma do oócito deve permitir e regular a reprogramação do núcleo do novo indivíduo (DE SOUSA; WATSON; SCHULTZ, 1998; VIGNEAULT et al., 2004).

O momento da AGE varia de acordo com a espécie, ocorrendo em torno de duas células em camundongos, quatro células em embriões humanos, oito células em bovinos e 16 células em coelhos (FABIAN et al., 2008; JURISICOVA; ACTON, 2004; LATHAM; SCHULTZ, 2001). Apesar da AGE em larga escala ocorrer às 8 células em embriões bovinos, existem evidências de atividade transcricional em estádios precoces, entre uma a

duas células (ADJAYE et al., 2007; BADR et al., 2007; BETTEGOWDA; LEE; SMITH, 2008; GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; KANKA, 2003; LI; CUI; KIM, 2006; MASSICOTTE et al., 2006; MEMILI; FIRST, 1998; MEMILI; DOMINKO; FIRST, 1998; MISIRLIOGLU et al., 2006; NIEMANN; WRENZYCKI, 2000), sugerindo que a AGE ocorre devido a uma ativação extremamente coordenada de grupos específicos de genes em múltiplos passos (BETTEGOWDA; LEE; SMITH, 2008; HYTTEL et al., 2001; KANKA, 2003).

Aproximadamente cerca de 60 a 70% dos oócitos fecundados não atingem o estágio de blastocisto. Grande parte destes embriões chega até o quarto ciclo celular e sofrem bloqueio. Estas variações na velocidade da clivagem estão associadas a alterações da qualidade e quantidade de suprimentos oocitários (BADR et al., 2007; BETTEGOWDA; LEE; SMITH, 2008; LONERGAN et al., 2003; MEMILI; FIRST, 2000). Assim, a ausência ou insuficiência de expressão gênica indicaria uma maior probabilidade do desenvolvimento ou do bloqueio do embrião. A incapacidade de manutenção do metabolismo básico pela dificuldade de sobrepor o mecanismo de repressão transcricional poderia levar à ausência de mensagens de sobrevivência, pela não ocorrência ou atraso do momento da AGE no caso de embriões incompetentes, o que levaria a um processo passivo de senescência e morte (BETTS; KING, 2001; QIU et al., 2003).

Contudo, o estoque oocitário abriga transcritos que podem ativar a sinalização para a morte celular programada (MCP), pois este elimina células foliculares e entra em degeneração após algumas horas da ovulação, quando não fecundado, visando a manutenção da homeostasia corporal (DALBIÈS-TRAN; MERMILLOD, 2003; ; HARWOOD et al., 2008; JURISICOVA et al.;1998; MEIRELLES et al., 2003; MEMILI; FIRST; 1998; VIGNEAULT et al., 2004; WARNER et al., 1998).

Caso existam mensagens sinalizadoras para MCP no estoque oocitário, deve haver um sistema de compensação entre transcritos de MCP e de sobrevivência para que ocorra o bloqueio ou o progresso do desenvolvimento. Assim, o destino de uma célula seria determinado pela habilidade dos supressores da MCP em seqüestrarem ou neutralizarem a ação dos indutores do processo (BADR et al., 2007; JURISICOVA et al.,1998; MEIRELLES et al., 2004; OPIELA et al., 2008; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002).

O balanço sobrevivência/morte poderia ser, então, um processo ativo, na tentativa de compensação de mensagens do estoque oocitário com os transcritos embrionários. Realmente, foi detectada uma maior proporção de transcritos em embriões com alta taxa de bloqueio do que naqueles embriões ditos competentes ao desenvolvimento (DODE et al., 2006; FAVETTA et al., 2007; 2004; FIGUEIREDO, 2005; JEONG et al., 2006; MATWEE; BETTS; KING, 2000; MEIRELLES et al., 2004). Estudos observaram a ocorrência de MCP de forma espontânea apenas após a AGE, ou que com o uso de indutores químicos, a apoptose ocorreu em maior grau após a AGE, contrariando

que a MCP seria um processo passivo por ausência de transcrição (FABIAN et al., 2007; GJORRET et al., 2007).

Devido a esta inconclusão a respeito da característica ativa ou passiva da MCP e conseqüente bloqueio do desenvolvimento em embriões bovinos no momento da AGE, é preciso estudar o perfil de regulação associado à sobrevivência e MCP nestes embriões. Com base em estudos que associavam a cinética de clivagem com o potencial de desenvolvimento (BREVINI et al., 2002; GUTIÉRREZ-ADAN et al., 2004; LONERGAN et al., 2003), Watanabe e colaboradores (2002) desenvolveram um sistema de separação de embriões de acordo com sua velocidade de clivagem. Os embriões de desenvolvimento rápido seriam aqueles que atingiriam o estágio de 8 células às 48 horas pós-inseminação (hpi), com alta taxa de desenvolvimento até blastocisto (58%) e os embriões lentos seriam aqueles que atingiriam este estágio apenas às 90 hpi, com 34% de taxa de blastocisto e maior taxa de bloqueio. Neste trabalho foi utilizado este sistema de divisão dos grupos embrionários com a finalidade de investigar o perfil de regulação gênica e quais as vias de sinalização utilizadas em caso de um processo de MCP e bloqueio ativo do desenvolvimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Período pré-implantação em bovinos

O período pré-implantação em mamíferos compreende desde a fecundação do oócito até pouco além do estágio de blastocisto, incluindo a formação do zigoto, a ativação do genoma embrionário (AGE) ou transição materno-zigótica (TMZ), a compactação e consequente polarização do epitélio embrionário e a diferenciação de mórula em blastocisto (JEONG et al., 2006; WRENZYCKI et al., 2005).

O oócito é uma das maiores células de um organismo, com diâmetro cerca de dez vezes maior que uma célula somática em mamíferos. Durante o desenvolvimento folicular, crescimento e maturação, os oócitos acumulam citoplasma volumoso contendo as biomoléculas que permitem o seu desenvolvimento, a maturação e também as primeiras clivagens embrionárias. Por outro lado, o espermatozóide tem pouco citoplasma, o que é um fator importante em células que precisam percorrer distâncias e competir com seus semelhantes (DALBIÈS-TRAN; MERMILLOD, 2003; MEIRELLES et al., 2003; STITZEL; SEYDOUX, 2007).

O processo de maturação oocitária compreende a maturação citoplasmática e a nuclear. A maturação citoplasmática inclui a reprogramação da síntese protéica, mudança de atividade da MPK (proteína quinase ativada por mitógenos) e do MPF (fator promotor de maturação, composto por $cdk1^{p34}$ e ciclina B), alterações morfológicas em organelas e alinhamento dos grânulos corticais próximos à membrana plasmática para facilitar a propagação de ondas de cálcio para a fecundação, prevenindo a polispermia. Na maturação nuclear ocorre reorganização dos microtúbulos, rompimento do envoltório nuclear, condensação cromossômica, progressão da meiose I com extrusão do primeiro corpúsculo polar e bloqueio em metáfase II. Na oogênese em mamíferos, os oócitos entram na prófase da primeira divisão meiótica e progridem até o estágio de Vesícula Germinativa (VG), no diplóteno da prófase I, quando há o primeiro bloqueio meiótico. *In vitro*, o reinício da meiose ocorre com a liberação do oócito pelo folículo, mas *in vivo* o estímulo ao reinício da meiose se dá após o pico de hormônio luteinizante (LH). Após o rompimento da VG e extrusão do primeiro corpúsculo polar, a maturação oocitária progride até a metáfase II, quando há novo bloqueio meiótico, permanecendo assim até o momento da fecundação (BADR et al., 2007; FISSORE; HE; WOULD, 1996; LIU; YANG, 1999; LONERGAN et al., 2003; STITZEL; SEYDOUX, 2007; WU et al., 1997)

A capacidade do oócito de ser fecundado e de manter o desenvolvimento embrionário até a AGE é chamada de competência oocitária. O potencial de desenvolvimento embrionário está associado a características de competência oocitárias como o diâmetro e a idade do folículo de origem, a morfologia do complexo cumulus-oócito (COC), a cinética nas primeiras clivagens e o estado de poliadenilação (BREVINI et al., 2002; HYTTEL et al., 2001; LONERGAN et al., 2003; MEIRELLES et al., 2004; MOUROT et al., 2006). O tamanho folicular é um fator essencial, pois quanto maior o folículo maior a competência oocitária, sendo necessário no mínimo que o diâmetro do folículo atinja 2 a 3 milímetros. De maneira geral, quanto maior o folículo e seu oócito maior será a taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; MACHATKOVA et al., 2004). Em relação à morfologia dos COCs, esta interfere na cinética, no potencial de desenvolvimento a blastocisto e no estoque de mRNA (BIASE et al., 2008; DE SOUSA; WESTHUSIN; WATSON, 1998; EMANUELLI, 2005; MOUROT et al., 2006). O potencial de desenvolvimento embrionário pode ser avaliado já no momento da primeira clivagem, pois embriões que concluem mais rapidamente este primeiro ciclo celular têm maior potencial de desenvolvimento a blastocisto e menor taxa de fragmentação nuclear (BREVINI et al., 2002; GARCIA, 2004; GUTIÉRREZ-ADAN et al., 2004; LONERGAN et al., 2003).

Durante a oogênese há um acúmulo de um grande número de mRNAs e proteínas. A estocagem ideal do mRNA materno de forma quiescente e a disponibilização deste durante a maturação e o desenvolvimento embrionário precoce são eventos cruciais não só na qualidade do oócito, mas também nos primeiros estádios da embriogênese a partir da iniciação das primeiras clivagens após a fecundação (BETTEGOWDA; LEE; SMITH, 2008; CUI; KIM, 2007; FAIR et al., 2007; GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; MISIRLIOGLU et al., 2006; WRENZYCKI; HERRMANN; NIEMANN, 2007). Dentre os mecanismos de estocagem do mRNA materno e sua regulação pós-traducional estão o controle do comprimento da cauda poli A na extremidade 3' UTR, a ligação destes RNAs a ribonucleoproteínas com conseqüente proteção contra a maquinaria traducional, a localização assimétrica do RNA no oócito, as alterações na fosforilação protéica e a presença de micro-RNAs que controlam a expressão destes mRNAs (CUI; KIM, 2007; GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; MURCHINSON et al., 2007; TANG et al., 2007; THELIE et al., 2007).

A regulação do comprimento da cauda poli A na extremidade 3' não traduzida (3'UTR) das moléculas de mRNA é o mais importante mecanismo de controle da atividade transcricional materna durante a maturação (CUI; KIM, 2007). A eficiência de estoque e reativação das moléculas estocadas determina a qualidade do oócito, sendo que o estado de poliadenilação dos genes transcritos está relacionado à competência de desenvolvimento embrionário e à velocidade da primeira clivagem. A baixa competência de desenvolvimento

embrionário é acompanhada pela quantidade de mRNAs maternos específicos, bem como pelo nível anormal de poliadenilação (BREVINI et al., 2002; CUI; KIM, 2007; GANDOLFI; GANDOLFI, 2001). Sequências específicas localizadas na região 3'UTR do mRNA garantem a poliadenilação e estabilidade dessas moléculas, permitindo que elas sejam estocadas e traduzidas sem que haja degradação. O controle traducional das mensagens maternas pela alteração de tamanho da cauda poli A é altamente conservado durante a evolução (BACHVAROVA, 1992; BREVINI et al., 2002; GUTIÉRREZ-ADAN et al., 2004; LONERGAN et al., 2003).

De acordo com estes parâmetros, é possível dividir os oócitos em grupos de alta ou baixa competência, o que permite estudos dos mecanismos que determinam a habilidade do oócito na manutenção do desenvolvimento (BREVINI et al., 2002; MACHATKOVA et al., 2004).

Além dos fatores intrínsecos ao oócito, há também a interação com os diferentes meios e ambientes de cultivo. Vários trabalhos demonstram que o ambiente de cultivo embrionário tem um efeito maior que a competência oocitária no padrão de expressão gênica e conseqüentemente na normalidade do blastocisto (GUTIÉRREZ-ADAN et al., 2004; LONERGAN et al., 2003; NIEMANN; WRENZYCKI, 2000; RIZOS et al., 2002).

O oócito maduro, aquele que está em metáfase II, reinicia a meiose após o estímulo do espermatozóide no momento da fecundação ou artificialmente na ativação partenogenética. Com a fecundação ocorre a extrusão do segundo corpúsculo polar e a cromatina restante no oócito origina o pronúcleo feminino, assim como há formação do pronúcleo masculino. A fusão dos pronúcleos haplóides dá origem ao zigoto diplóide pela união dos conjuntos cromossômicos (BADR et al., 2007; CUI; KIM, 2007; JEONG et al., 2006). Estas intensas alterações morfológicas e fisiológicas são acompanhadas por mudanças no padrão de expressão gênica. Neste momento, ocorre a iniciação da transcrição no embrião e a substituição do mRNA materno pelo mRNA embrionário, a chamada ativação do genoma embrionário (AGE) ou transição materno-zigótica (TMZ), a ser discutida no próximo tópico (KANKA, 2003; LATHAM; SCHULTZ, 2001; LI; CUI; KIM, 2006; Figura 1).

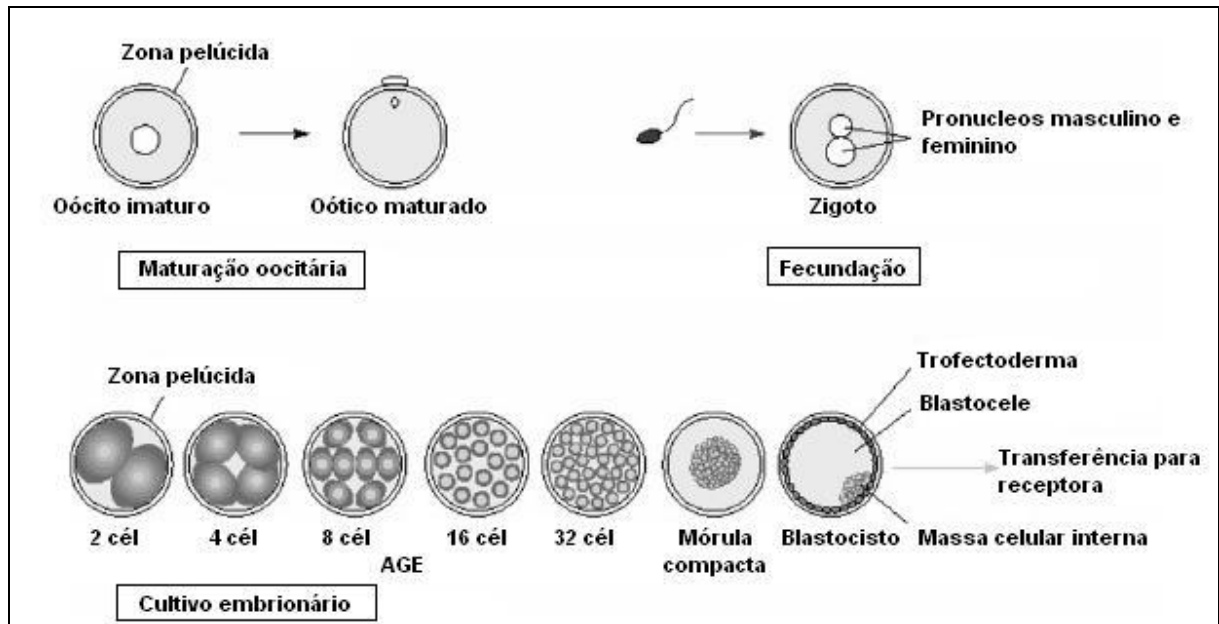


Figura 1. Fases do desenvolvimento embrionário bovino. Maturação: da VG até MII, com extrusão do 1º corpúsculo polar. Fecundação: formação do zigoto e extrusão do 2º corpúsculo polar. Cultivo: clivagens e divisão dos blastômeros, formação da mórula e diferenciação em massa celular interna e trofotoderma no blastocisto. AGE ocorre entre 8 e 16 células. Fonte: adaptado de Badr et al., 2007 .

2.2 Ativação do genoma embrionário (AGE) ou Transição Materno Zigótica (TMZ)

Durante o desenvolvimento folicular, o oócito é transcricionalmente quiescente no folículo primordial e primário. No folículo secundário, inicia-se a transcrição de mRNA e rRNA, sendo possível detectar um nucléolo sintetizador de ribossomo. A transcrição e a atividade nucleolar são aumentadas no folículo terciário, formando RNAs e proteínas para uso imediato pelo oócito e também para estoque. Com o acúmulo desta informação, o oócito gradualmente adquire competência para o desenvolvimento, até chegar ao estágio de VG, quando ocorre a queda do nível de transcrição e da atividade nucleolar (DALBIÈS-TRAN; MERMILLOD, 2003; HYTTEL et al., 2001). A transcrição permanece relativamente baixa e constante do momento de quebra da VG ao reinício da meiose, ocorrendo um aumento da atividade transcricional em embriões de duas ou mais células dependendo da espécie (COENEN; MASSICOTTE; SIRARD, 2004; DALBIÈS-TRAN; MERMILLOD, 2003; MEMILI; DOMINKO; FIRST, 1998). O conteúdo de RNA total é estimado em cerca de 2ng durante a maturação, sendo o RNA ribossômico (rRNA) o mais abundante (65%) e o mRNA poliadenilado representando 10% do total. O rRNA parece não ser degradado enquanto o RNA poliadenilado é reduzido a menos da metade após a maturação (DALBIÈS-TRAN; MERMILLOD, 2003; LEQUARRE et al., 2004). O sucesso do desenvolvimento de um oócito

fecundado leva a divisões celulares e requer a iniciação e subsequente regulação da transcrição embrionária (LI; CUI; KIM, 2006).

A transição materno-embrionária (TMZ) ou ativação do genoma embrionário (AGE) é um fenômeno complexo caracterizado pela iniciação da transcrição no embrião e a substituição do mRNA materno pelo mRNA embrionário via eventos nucleares e citoplasmáticos. A AGE tem pelo menos três funções: a destruição dos transcritos específicos de oócitos, a substituição dos transcritos maternos pelos transcritos embrionários e a alteração do padrão de expressão genética (ADJAYE et al., 2007; KANKA, 2003; LI; CUI; KIM, 2006; ZENG; BALDWIN; SCHULTZ, 2004). A degradação gradual do mRNA materno e a AGE são fatores de fundamental importância para o sucesso do desenvolvimento embrionário, pois a expressão gênica adequada é necessária para a manutenção dos padrões corretos do desenvolvimento oocitário e também do embrião (BREVINI et al., 2002; KANKA, 2003; MEMILI; FIRST, 1998). O mRNA e as proteínas estocadas no oócito são utilizados nas primeiras clivagens e, posteriormente, o embrião deve iniciar a transcrição dos genes necessários ao seu desenvolvimento. O citoplasma do oócito permite que o núcleo do zigoto inicie seu programa de desenvolvimento, sendo também responsável por sua regulação (DE SOUSA; WATSON; SCHULTZ, 1998; VIGNEAULT et al., 2004).

A regulação da transcrição neste período está estritamente relacionada à estrutura cromatínica e ao conteúdo macromolecular do citoplasma. A estrutura cromatínica compreende os diferentes tipos de histonas, com alterações mediadas por acetilases, desacetilases e metiltransferases, além de inúmeros fatores que se associam ao DNA e regulam a disponibilidade e a especificidade do genoma para a transcrição. A disposição dos nucleossomos ao longo da fita de DNA também pode afetar a capacidade de ligação de outras proteínas a este DNA (BETTEGOWDA; LEE; SMITH, 2008; KANKA, 2003; LATHAM; SCHULTZ, 2001; ZHENG et al., 2004).

A regulação da transcrição não depende apenas da estrutura cromatínica, mas também de alterações no conteúdo citoplasmático, especialmente da disponibilidade e atividade de fatores de transcrição (KANKA, 2003; SCHIER, 2007). Neste caso, uma atividade adequada da RNA polimerase II via fosforilação é importante para a ativação da transcrição. Os fatores de transcrição sintetizados a partir do mRNA materno e a expressão estádio-específica de outros fatores após o recrutamento deste mRNA são responsáveis pelo total de fatores de transcrição necessários à AGE. As trocas na estrutura cromatínica e a síntese dos fatores de transcrição exigem que os eventos nucleares (reorganização da cromatina e acetilação de histonas) e os eventos citoplasmáticos (síntese proteica e ativação pós-traducional dos fatores de transcrição) estejam coordenados, a fim de controlar

a especificidade e o momento da ativação do genoma embrionário (BETTEGOWDA; LEE; SMITH, 2008; LATHAM; SCHULTZ, 2001; ZHENG et al., 2004).

Em bovinos, a AGE ocorre essencialmente no estágio de oito a dezesseis células, quando há um aumento na duração do ciclo celular provavelmente devido ao início da atividade transcricional. Entretanto, há ocorrência de atividade transcricional de origem embrionária no estágio de uma a duas células, com ativação de um complexo de iniciação constituído por ativadores transcricionais, o DNA a ser transcrito e a RNA polimerase II, sugerindo que a iniciação da transcrição não está vinculada a um estágio único e específico (Figura 2; ADJAYE et al., 2007; BADR et al., 2007; BETTEGOWDA; LEE; SMITH, 2008; GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; KANKA, 2003; LI; CUI; KIM, 2006; MASSICOTTE et al., 2006; MEMILI; FIRST, 1998; MEMILI; DOMINKO; FIRST, 1998; MISIRLIOGLU et al., 2006; NIEMANN; WRENZYCKI, 2000).

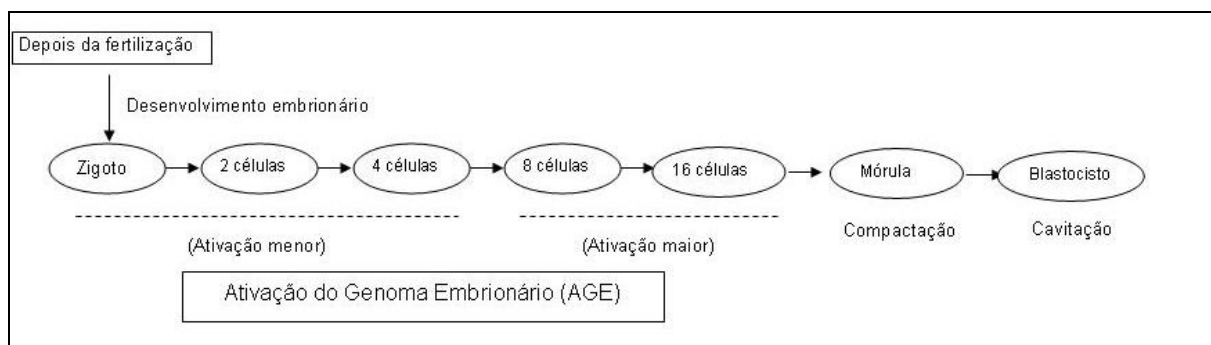


Figura 2. Ativação do genoma embrionário menor e maior durante os eventos do desenvolvimento embrionário em bovinos. A AGE maior ocorre no estágio de 8 a 16 células, mas há atividade transcricional de origem embrionária menor no estágio de 1 a 2 células. Portanto, a AGE ocorre em múltiplas etapas durante o período de pré-implantação em bovinos. Fonte: adaptado de Badr et al., 2007

Estas observações confirmam que a ativação do genoma embrionário ocorre em múltiplas etapas durante o período de pré-implantação, que compreende a formação do zigoto, a AGE e o início da diferenciação celular (BETTEGOWDA; LEE; SMITH, 2008; HYTTEL et al., 2001; KANKA, 2003). Após a fecundação, a progressão das clivagens com conseqüente formação do blastocisto e implantação embrionária dependem da expressão orquestrada de grupos específicos de genes e da interação do embrião com o ambiente. Nos eventos do período de pré-implantação, a tradução é realizada utilizando mRNAs e proteínas sintetizados e estocados durante o crescimento do oócito. O desenvolvimento posterior depende do controle da expressão gênica pelo embrião. Em bovinos, cerca de dez mil genes são necessários ao desenvolvimento embrionário (BREVINI et al., 2002;

DALBIÈS-TRAN; MERMILLOD, 2003; JURISICOVA et al., 1998; MOHAN et al., 2002), enquanto em camundongos são necessários aproximadamente quatorze mil genes (ZENG; BALDWIN; SCHULTZ, 2004). Já foram identificados vários genes diferencialmente expressos nos eventos primários da embriogênese, com transcrição de novas moléculas de mRNA e manutenção de mRNAs maternos até estádios mais tardios após a AGE, além de uma variação na abundância individual de determinados transcritos entre oócitos e blastocistos associada à morfologia do oócito (DE SOUSA et al., 1998; KANKA et al., 2003; MISIRLIOGLU et al., 2006; MOHAN et al., 2002; TESFAYE et al., 2003; ZENG; BALDWIN; SCHULTZ, 2004; ZHENG et al., 2004).

No momento da AGE, as mudanças epigenéticas, como metilação e modificações nas histonas, a inativação de componentes da maquinaria transcricional e a depleção dos estoques de mRNA e proteínas maternos são responsáveis pela regulação de expressão do genoma embrionário. Esta degradação de mRNA materno é mediada pela ligação de seqüências regulatórias na extremidade 3'UTR, como os micro-RNAs, e possivelmente remove produtos que possam interferir negativamente no desenvolvimento embrionário tardio (Figura 3; BETTEGOWDA; LEE; SMITH, 2008; MURCHINSON et al., 2007; SCHIER et al., 2007; STITZEL; SEYDOUX, 2007; TANG et al., 2007; THELIE et al., 2007).

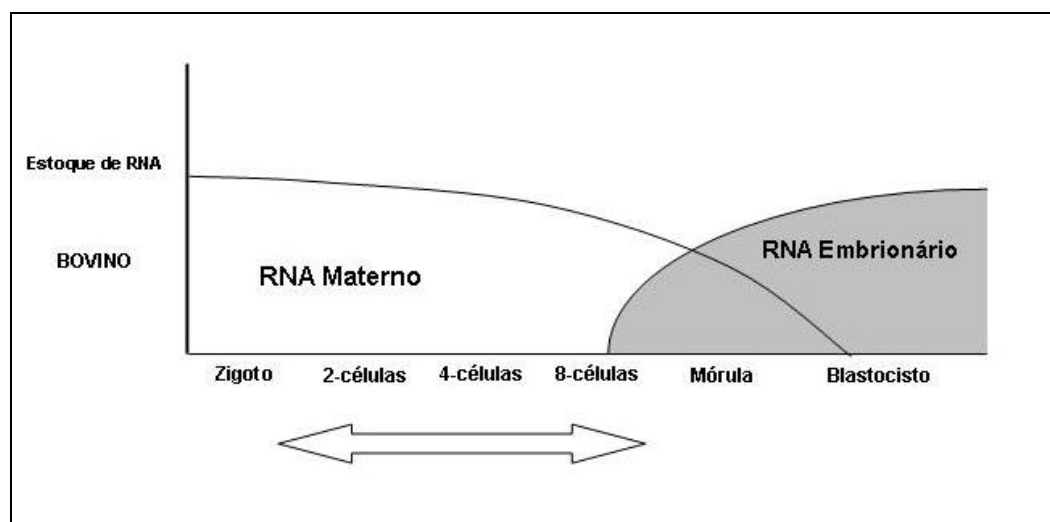


Figura 3. Depleção dos estoques de RNA materno e aumento de transcrição do RNA embrionário associados à transição materno-zigótica no estágio de 8 células em embriões bovinos. Fonte: adaptado de Niemann, Carnwath, Kues, 2007.

2.3 Bloqueio do desenvolvimento embrionário

No período de pré-implantação, a manutenção das primeiras clivagens após a fecundação é realizada utilizando mRNAs e proteínas sintetizados e estocados durante a oogênese. Em bovinos, o embrião deve ser responsável pela transcrição e tradução de informações do seu próprio genoma a partir do quarto ciclo celular, quando há a substituição gradual de transcritos maternos pelos embrionários (BETTEGOWDA; LEE; SMITH, 2008; CUI; KIM, 2007; FAIR et al., 2007; GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; KANKA, 2003; MISIRLIOGLU et al., 2006; WRENZYCKI; HERRMANN; NIEMANN, 2007). Nesta fase, entretanto, os embriões cultivados *in vitro* são sensíveis ao bloqueio do desenvolvimento em estádios que coincidem com a AGE. No caso do bovino, este bloqueio é observado predominantemente no quarto ciclo celular. No total de oócitos fecundados, apenas 30 a 40% originam embriões que alcançam o estágio de blastocisto e o restante sofre algum tipo de bloqueio. Esta parada do desenvolvimento não tem suas causas completamente elucidadas, mas é atribuída em partes a influências intrínsecas e extrínsecas ao ambiente citoplasmático e/ou nuclear do oócito e também do embrião (BADR et al., 2007; BETTEGOWDA; LEE; SMITH, 2008; LONERGAN et al., 2003; MEMILI; FIRST, 2000).

As variações na velocidade da clivagem estão associadas a alterações da qualidade e quantidade de suprimentos oocitários; a ausência ou insuficiência de expressão gênica indicaria a maior probabilidade do desenvolvimento ou do bloqueio do embrião. O bloqueio embrionário tem sido considerado um evento causado por um mecanismo passivo, gerado pela exaustão de reservas maternas de mRNA e proteínas ou incapacidade de sobrepor o estado de repressão transcricional, levando à ausência ou deficiência na síntese de informações importantes para a manutenção do desenvolvimento ou início da AGE (BETTS; KING, 2001; QIU et al., 2003).

Entretanto, acredita-se que uma das funções primárias da AGE seja a prevenção da morte celular programada (MCP) ou apoptose, uma vez que o oócito apresenta informações capazes de ativar este mecanismo de morte celular quando não fertilizado e na atresia folicular, com eliminação das células foliculares da granulosa e da teca (DALBIÈS-TRAN; MERMILLOD, 2003; HARWOOD et al., 2008; JURISICOVA et al., 1998; MEIRELLES et al., 2003; MEMILI; FIRST; 1998; VIGNEAULT et al., 2004; WARNER et al., 1998; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2000). A incapacidade do embrião em manter o balanço entre fatores pró e anti-apoptóticos poderia levar à MCP, culminando no bloqueio do desenvolvimento embrionário (JURISICOVA et al., 1998; MEIRELLES et al., 2004; 2003).

Vários estudos verificaram a expressão de um grande número de genes em embriões com alta taxa de bloqueio quando comparados a embriões com baixa taxa de bloqueio, incluindo genes importantes cuja transcrição diferencial está associada à

sobrevivência ou morte celular (DODE et al., 2006; FAVETTA et al., 2007; 2004; FIGUEIREDO, 2005; JEONG et al., 2006; MATWEE; BETTS; KING, 2000; MEIRELLES et al., 2004). Observações em várias espécies, incluindo a bovina, mostram que a MCP espontânea não ocorre em estádios anteriores a AGE, e a resposta a indutores de MCP no meio de cultivo também é baixa antes da AGE. Apenas após a AGE houve o surgimento de MCP espontânea e uma maior taxa de indução por agentes químicos (FABIAN et al., 2007; GJORRET et al., 2007). Assim, a AGE seria um fenômeno necessário para a ocorrência da apoptose, independente se espontânea ou induzida. Todas estas evidências sugerem que o bloqueio não é necessariamente um mecanismo passivo, mas sim um mecanismo ativo na qual os embriões precisam que ocorra a AGE para eliminar embriões ou blastômeros indesejáveis ou alterados via MCP (MATWEE; BETTS; KING, 2000; MEIRELLES et al., 2004).

2.4 Morte Celular: Necrose/Oncose e Apoptose

O oócito possui no seu estoque mensagens e proteínas capazes de ativar a cascata de morte celular, enquanto que os eventos da fecundação e da AGE devem promover a produção de moléculas que inibam esta cascata (DALBIÈS-TRAN; MERMILLOD, 2003; JURISICOVA et al., 1998). A morte celular pode ocorrer por dois processos morfológicamente distintos: necrose ou oncose e apoptose ou morte celular programada (MCP).

A oncose é um processo passivo, que ocorre na ausência de ATP e está caracterizada pela rápida desintegração de organelas celulares, desintegração nuclear, perda da integridade da membrana plasmática com conseqüente liberação de constituintes intracelulares para o meio extracelular, o que estimula a resposta inflamatória e amplia a lesão tecidual. A oncose é induzida por agentes químicos, físicos e biológicos e causa danos ao embrião ou ao tecido como um todo (BADR et al.; 2007; BETTS; KING, 2001; CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; GUIMARÃES; LINDEN, 2004; MATWEE; BETTS; KING, 2000; PENALOZA et al., 2006).

A palavra apoptose foi adotada na década de 70 e refere-se a todos os mecanismos e processos envolvidos antes, durante e depois da morte celular: indução da morte celular por estímulos externos, desencadeamento de mecanismos morfológicos e bioquímicos, absorção dos corpos apoptóticos por fagócitos ou células vizinhas. Essencialmente a apoptose é composta de quatro fases, a saber, (1) fase inicial, quando um estímulo provoca a resposta apoptótica, podendo ser um estímulo externo mediado por receptores de superfície ou ser originado internamente, por ação de drogas, toxinas ou insultos ao DNA; (2) fase de transdução de sinal, quando há detecção do estímulo ou estado metabólico e ocorre a transdução do sinal para a maquinaria efetora de apoptose; (3) fase efetora de ativação das caspases e (4) fase pós apoptose, quando a cromatina e o DNA são degradados e as células são reconhecidas e fagocitadas (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; MATWEE; BETTS; KING, 2000).

Já o uso da terminologia MCP envolve apenas os mecanismos morfológicos e bioquímicos específicos que a própria célula desencadeia para induzir sua morte (TILLY, 1996). Assim, a partir deste momento será adotado este último termo para designar o processo de morte celular natural em si, sem a fase de fagocitose.

A MCP, ao contrário da oncose, é um processo ativo que requer reservas de ATP, caracterizado pela autodigestão controlada dos constituintes celulares, devido à ativação das proteases intracelulares, cuja atividade compromete a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular sem que haja extravasamento do

conteúdo celular para o meio externo, evitando a resposta inflamatória (BETTS; KING, 2001; GUIMARÃES; LINDEN, 2004; MATWEE; BETTS; KING, 2000). Morfologicamente, as células que iniciam este processo sofrem condensação nuclear e cromatínica, diminuem seu volume citoplasmático mantendo suas organelas intactas, mas a membrana celular forma vesículas (corpúsculos apoptóticos) que contém fragmentos do núcleo e algumas organelas. Em células saudáveis, a distribuição da fosfatidilserina se faz na porção interna da bicamada lipídica da membrana celular. Na MCP este lipídio é exposto na porção externa da membrana e o novo posicionamento da fosfatidilserina serve como sinalizador para que as células fagocitárias englobem os corpúsculos apoptóticos, quando são degradados e reciclados, completando a MCP (BETTS; KING, 2001; CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; GUIMARÃES; LINDEN, 2004; MATWEE; BETTS; KING, 2000; PENALOZA et al., 2006). Bioquimicamente, a MCP é caracterizada pela fragmentação do DNA, alterações mitocondriais e ativação de proteases cisteínas denominadas caspases (BADR et al., 2007; BETTS; KING, 2001; CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; MATWEE; BETTS; KING, 2000).

A MCP é um processo fisiológico conservado evolutivamente que envolve uma complexa via de sinalização bioquímica, fundamental para a manutenção da homeostase tecidual, desenvolvimento e metamorfose de animais, morfogênese de órgãos e remoção de células infectadas ou danificadas em todos os organismos multicelulares (Figura 4). A MCP ocorre normalmente na atresia folicular, luteólise, nas células foliculares e no oócito na ausência de fecundação, sendo também essencial à embriogênese normal, pois elimina seletivamente blastômeros anormais e células da massa celular interna que tenham potencial de originar células do trofotoderma (BADR et al., 2007; FABIAN et al., 2007; JACOBSON, WEILL, RAFF, 1997; JOZA, 2001; KIM; TILLY, 2004; SKOMMER; WLODKOWIC; DEPTALA, 2007). Assim, no período pré-implantação os embriões ou blastômeros alterados tendem a ser eliminados, evitando gastos energéticos na promoção do crescimento de embriões ou células comprometidas.

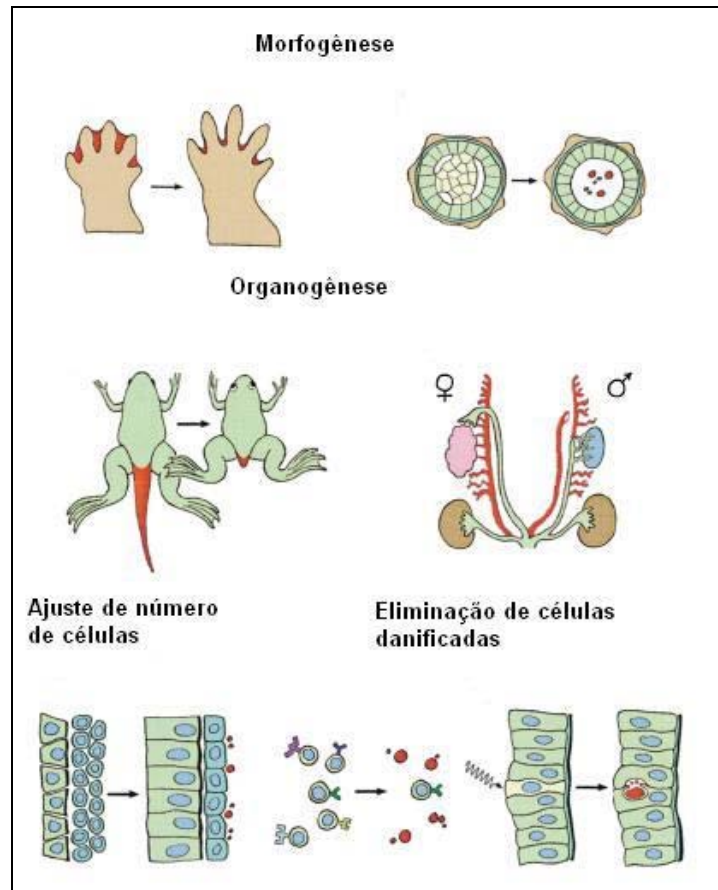


Figura 4. Algumas funções da morte celular programada no desenvolvimento animal. Fonte: adaptado de Jacobson, Weill, Raff, 2007.

Existem basicamente duas vias de indução da MCP, a via intrínseca e a via extrínseca. A via intrínseca é mediada pela mitocôndria e a via extrínseca é mediada por receptores de morte na superfície celular (Figura 5; CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; DANIAL; KORSMEYER, 2004; GREEN; EVAN, 2002; GREEN; REED, 1998; GUIMARÃES; LINDEN, 2004; GUPTA, 2003; HAJRA; LIU, 2004; NAGATA, 1997; OPIELA et al., 2008). Na via intrínseca, os sinais de morte induzem os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (*B cell leukemia/lymphoma 2*) a transferir os sinais para a mitocôndria, facilitando a montagem de proteínas apoptóticas nos poros da membrana mitocondrial externa. Isto altera a permeabilidade da membrana e permite a liberação de íons de cálcio mitocondrial para o citoplasma e também de vários fatores, como o citocromo c, que originalmente está no espaço intermembranas da mitocôndria. No citoplasma, o citocromo c se liga à proteína citosólica Apaf-1 (*Apoptotic protease-activating factor 1*), e ambos ligam-se à pró-caspase 9 na presença de ATP, formando um complexo denominado apoptossomo. O complexo ativa as caspases efetoras 3 e 7, levando à MCP (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; CRADDOCK et al., 1999; DANIAL; KORSMEYER, 2004; HAJRA; LIU, 2004;

GUPTA; 2003; OPIELA et al., 2008; WYMAN; ZVELEBIL; LAFFARGUE, 2003). Além da liberação do citocromo c, a perda do potencial de membrana mitocondrial permite a liberação de proteínas que promovem MCP dependente de caspases (Smac/DIABLO - *second mitochondria derived activator of caspase* e Omi/HtrA2 - *HtrA serine peptidase 2*) ou independentes destas (AIF - *apoptosis inducing factor*, Endo G - endonuclease G e Omi/Htra2; Figura 6). Ambas as vias são reguladas por uma família de proteínas denominadas IAPs (inibidoras de MCP; DANIAL; KORSMEYER, 2004; GUIMARÃES; LINDEN, 2004; HAO et al., 2004; JOZA et al., 2001; LOTZ; PYROWOLAKIS; JENTSCH, 2004; MARTIN, 2004; PARK et al., 2007; QIU; GOLDBERG, 2005; REN et al., 2005; SKOMMER; WLODKOWIC; DEPTALA, 2007). Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 atuam na regulação da permeabilidade de membrana, que é determinada pela razão de membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; GREEN; 2005).

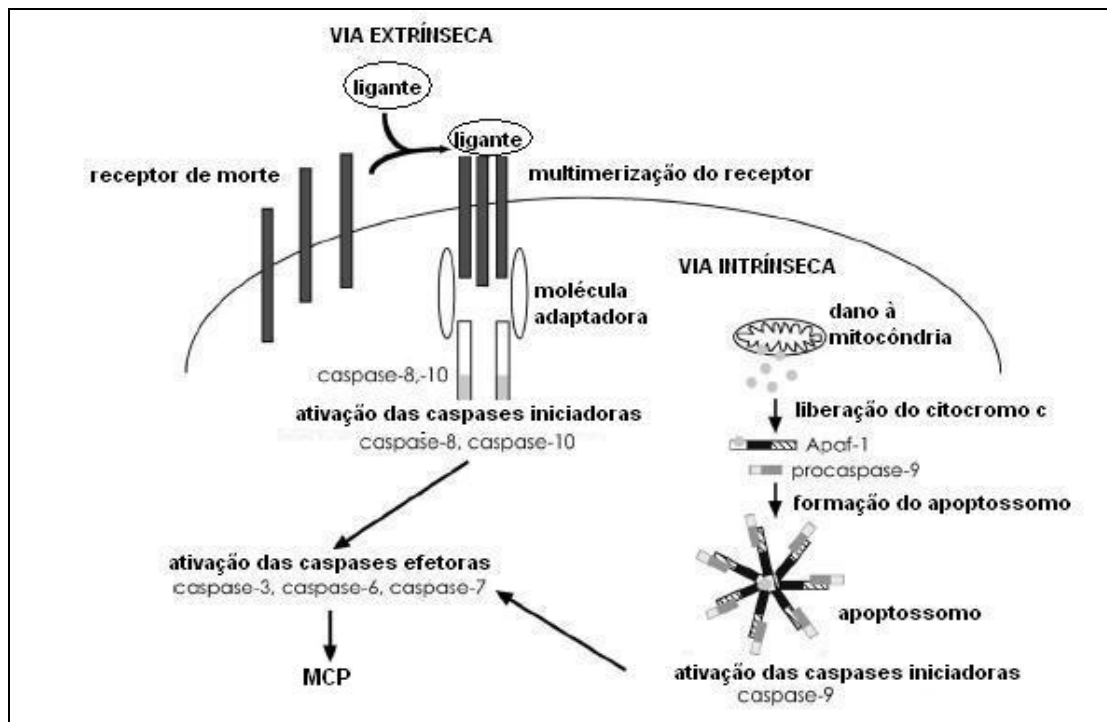


Figura 5. Esquema das vias extrínseca e intrínseca da MCP. A via extrínseca é disparada pela ligação do ligante ao receptor. A molécula adaptadora liga-se ao domínio de morte citoplasmático do receptor, ativando as caspases iniciadoras, que resultam na ativação das caspases efetoras. A via intrínseca é disparada após um dano mitocondrial, levando à liberação do citocromo c, com subsequente formação do apoptossomo (citocromo c + Apaf-1 + pró-caspase 9). Após ativação da caspase 9, a via intrínseca converge com a extrínseca, no momento de ativação das caspases efetoras, levando à MCP. Fonte: adaptado de Hajra; Liu, 2004.

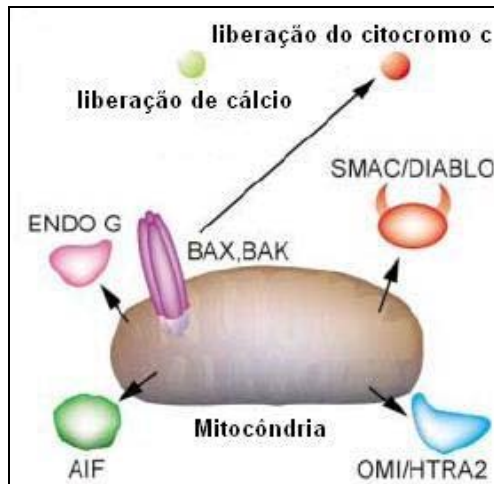


Figura 6. Ligação de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 à membrana mitocondrial, permitindo a liberação de íons cálcio, do citocromo c, das proteínas Smac/DIABLO, Omi/Htra2, do fator AIF e da Endo G ao citoplasma, onde estas irão contribuir à sinalização da MCP. Fonte: adaptado de Danial, Korsmeyer, 2004.

A via extrínseca da MCP é iniciada pela ligação de ligantes aos receptores de morte Fas/Apo/CD95 (*TNF receptor superfamily, member 6*), TNFR-1/p55/CD120 (*tumor necrosis factor receptor*), IFN (*interferon*) e TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) na membrana celular. Os receptores de morte têm domínios extracelulares que interagem com os ligantes e transmitem os sinais apoptóticos por domínios intracelulares de morte (DD), domínios efetores de morte (DED) e domínios que recrutam caspases (CARD). Os domínios CARD iniciam a ativação de proteínas adaptadoras e de um complexo de sinalização indutor de morte (DISC). Este complexo leva à ativação da cascata de caspases, que culminam com a ativação de caspases efetoras, levando à MCP por inúmeras vias de sinalização distintas, que incluem uma ampla gama de proteínas (Figura 7). Devido a este fato, as proteínas associadas às vias extrínsecas estão relacionadas a muitas doenças, incluindo o diabetes e diversos tipos de cânceres (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; DANIAL; KORSMEYER, 2004; EISENMANN, 2005; FÖRCH; VALCÁRCEL, 2001; GREEN; EVAN, 2002; GREWAL; ENRICH, 2006; HARWOOD et al., 2008; HAYWARD; KALMAR; ARIAS, 2008; HEMMING et al., 2001; HOLT; SIDDLE, 2005; KAUFFMANN-ZEH et al., 1997; KWONS et al., 2006; LA et al., 2004; LANGLAIS et al., 2004; MANSER; WOOD, 1990; McALINDEN et al., 2007; NAGATA, 1997; PIECYK et al., 2000; SUNDARAM, 2006; WICK et al., 2003; WOLLMANN et al., 2007; XU et al., 2003; YAMANE; WU; CHEN, 2002; ZENG; HU; LI, 2005). O fator de transcrição NF- κ B consiste em uma das principais vias de sinalização para sobrevivência celular, e é regulado negativamente pela via de sinalização do TNF (*tumor necrosis factor*), interferindo na expressão de muitos genes ligados à esta via, como a PI3K (*Fosfatidilinositol 3-kinase*), o COL1A2 (*Collagen type I, alpha 2*), DEK

(D6S231E DEK/NUP214 *fusion gene*), LBC/AKAP13 (*A kinase PRKA anchor protein 13*), KLF5 (*Krüppel-like transcription factor 5*) e STAT4 (*signal transducers and activators of transcription 4*), além de muitos outros (BONVIN et al., 2002; BÜTTNER; SKUPIN; RIEBER, 2004; CHEN et al., 2004; CHUNG et al., 1996; GINGERY et al., 2003; GUTIÉRREZ-AGUILAR et al., 2007; HAYDEN; GHOSH, 2008; KANE; LIN; WEISS, 2002; KIM; DREYFUSS, 2001; KOUBA et al., 1999; KUIVANIEMI; TROMP; PROCKOP, 1991; LEBAN et al., 2007; NAKAJIMA et al., 2008; REMOLI et al., 2007; SAMMONS et al., 2006; SHIBOLET et al., 2007; VERRECCHIA; WAGNER; MAUVIEL, 2002; WALDMANN et al., 2004).

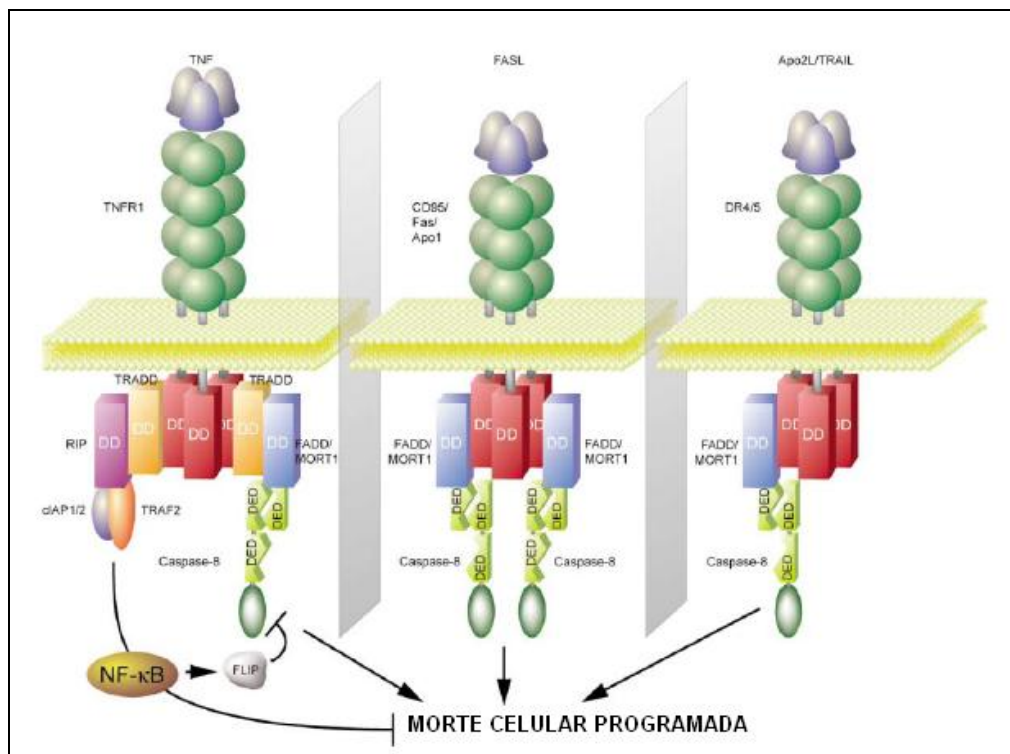


Figura 7. Via extrínseca da MCP com ligação de ligantes aos receptores TNFR-1, Fas e TRAIL na membrana celular. Os receptores transmitem os sinais por domínios DD, DED e CARD, que ativam a sinalização da cascata de caspases, além de outras moléculas, que culminam com a ativação de caspases efetoras, levando à MCP. Fonte: adaptado de Danial, Korsmeyer, 2004.

As duas principais famílias de proteínas que estão envolvidas na regulação do mecanismo genético da MCP são aquelas que mediam os processos proteolíticos (caspases) e aquelas que regulam a atividade das caspases (família do Bcl-2). As caspases são proteases que residem principalmente no citoplasma sob a forma inativa, tornando-se ativas com a clivagem proteolítica à altura do ácido aspártico. Foram identificadas 14

caspases em mamíferos. Uma vez ativadas, as caspases iniciadoras 8, 9 e 10 têm a capacidade de catalisar a ativação de várias outras caspases, resultando em amplificação da cascata até a ativação de caspases efetoras 3, 6 e 7. A atividade das caspases é executar a clivagem proteolítica de muitas proteínas que garantem a integridade e sobrevivência celular, em resposta tanto a estímulos da via extrínseca como da intrínseca (BETTS; KING, 2001; BRATTON et al., 2000; CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; GUIMARÃES; LINDEN, 2004). As inibidoras de caspases (IAPs) regulam a atividade das mesmas e são caracterizados pela presença de um domínio denominado *baculoviral IAP repeat* (BIR). As IAPS atuam na inibição de caspases tanto da via extrínseca quanto da via intrínseca (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; HAJRA; LIU, 2004; HAO et al., 2004; MARTIN, 2004; PARK et al., 2007).

Os membros da família Bcl-2 são reguladores das alterações mitocondriais durante a apoptose e estão presentes no citoplasma ou nas mitocôndrias. Elas atuam na formação dos poros de membrana mitocondriais, interagindo e regulando canais já existentes, levando à alteração da permeabilidade da membrana (SKOMMER; WLODKOWIC; DEPTALA, 2007). Esta família é composta por cerca de 30 genes, divididos em anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, MCL-1, Al, Boo) e pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bok, Bik, HRK, Bnip3, Bim, Bad, Bid, Bcl-X_s, entre outros). Essas proteínas compartilham estruturas homólogas dos domínios BH1, 2, 3 e 4, embora nem todos os membros possuam todos os domínios. Os domínios BH1 e BH2 dos antagonistas são necessários para heterodimerizar com os agonistas de morte e, inversamente, o domínio BH3 dos agonistas da morte é requerido para que ocorra a heterodimerização com os antagonistas da morte para promover a morte celular (Figura 8). Entre os membros pró-apoptóticos estão aqueles que são formadores de canais, como o Bax, o Bak e o Mtd. A proteína Bax (*Bcl-2-associated X protein*), na ausência de estímulos apoptóticos encontra-se predominantemente solúvel no citoplasma. Na presença de estímulos apoptóticos, ocorre a translocação dessa proteína do citosol para as mitocôndrias e sua inserção nas membranas mitocondriais, alterando sua permeabilidade. A decisão para uma resposta apoptótica depende do balanço entre fatores de morte e de sobrevivência, indicando que a razão entre os membros da família Bcl-2 têm papel crucial na determinação da sensibilidade celular. As proteínas da família Bcl-2 não estão apenas envolvidas em interações mútuas, mas tem relação com grande número de fatores fora da família, como a proteína ITM2B (Proteína integral de membrana 2B; BADR et al., 2007; CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; FLEISCHER et al., 2002, FLEISCHER; AYLLON; REBOLLO, 2002; JURISICOVA; ACTON, 2004; SKOMMER; WLODKOWIC; DEPTALA, 2007).

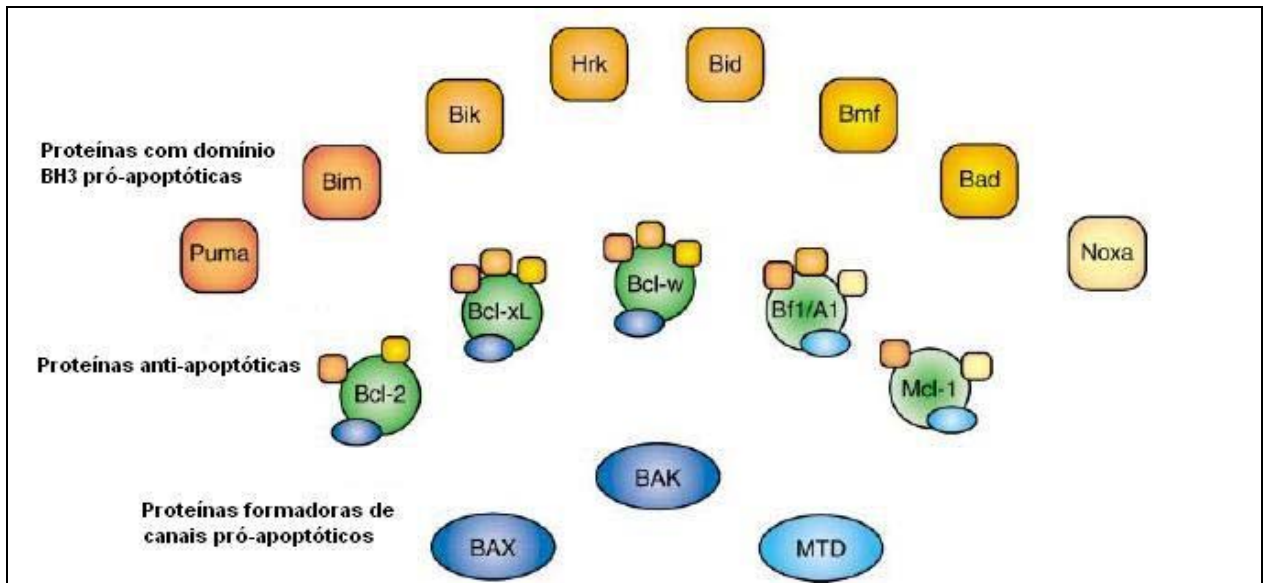


Figura 8. Interações entre membros da família Bcl-2. Estão representadas as três principais sub-famílias de Bcl-2: pró-apoptóticos (quadrados laranjas), anti-apoptóticos (círculos verdes) e formadores de canais pró-apoptóticos (formas ovais azuis). As alterações de coloração mostram as afinidades de ligação entre os membros. Fonte: adaptado de Jurisicova, Acton, 2004.

As quinases dependentes de ciclinas (CDKs), ciclinas e inibidores de CDKs (CKIs) estão estritamente associadas a esta decisão celular de ativar o programa de morte, sendo também grandes reguladoras do ciclo celular. A indução de divisão ou bloqueio celular depende do contexto dos sinais enviados à célula, e devido à importância destas proteínas na regulação do ciclo celular, elas estão envolvidas em muitos tipos de cânceres (CALÓ et al., 2003; DAVEY; HEATH; STARR, 2006; ENDO et al., 1997; GREWAL; ENRICH, 2006; STARR; HILTON, 1998; STARR et al., 1997; VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003; YASUDA et al., 1999). A proteína p53 (*53kD protein*) é outra reguladora do ciclo celular e importante mediadora de respostas celulares ao estresse, via sua interação com aproximadamente 50 genes. Os sinais para sobrevivência ou morte são transmitidos até a p53 por modificações pós-traducionais (fosforilação, acetilação, metilação e ubiquitinação), resultando em inativação ou ativação de p53. Apesar da presença de transcritos de p53 em embriões bovinos, a presença da proteína não foi confirmada (CERVONI et al., 2006; CHARPIN et al., 1997; CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; FAVETTA et al., 2004; KUMAGAI et al., 2006; LEE; KUMAGAI; DUNPHY, 2007; LEVAV-COHEN et al., 2005; MATWEE; BETTS; KING, 2000).

A sinalização para a MCP é regulada por genes herdados matematicamente ou transcritos do genoma embrionário. O destino de uma célula é determinado pela habilidade dos supressores da MCP em seqüestrarem ou neutralizarem a ação dos indutores do processo. Assim, a concentração relativa de proteínas pró e anti-apoptóticas pode

determinar a morte ou a sobrevivência da célula (BADR et al., 2007; JURISICOVA et al.; 1998; MEIRELLES et al., 2004; OPIELA et al., 2008; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002). Contudo, a MCP difere entre os estádios embrionários, e a correlação entre a sensibilidade do embrião a um indutor de morte e o estágio do desenvolvimento indica a existência de mecanismos específicos de repressão apoptótica, que devem ser gradualmente eliminados com o progresso do desenvolvimento. Assim, embriões em estágio anteriores à AGE têm baixa capacidade de ativar um mecanismo de indução de MCP. No entanto, os oócitos são capazes de ativar esse mecanismo quando não fertilizados e também para eliminar células foliculares (DALBIÉS-TRAN; MERMILLOD, 2003; JURISICOVA et al., 1998). Foi observada MCP espontânea apenas após a AGE em várias espécies até hoje estudadas, incluindo em embriões bovinos (FABIAN et al., 2007; GJORRET et al., 2003). Acredita-se que a MCP espontânea em embriões é consequência de uma ativação de genes indutores de apoptose em células anormais ou uma ativação irregular de genes supressores de apoptose em células normais, pois as células embrionárias possuem a maquinaria para a condução do programa apoptótico em caso de estímulo (FABIAN et al., 2007; GJORRET et al., 2007). Trabalhos com humanos e camundongos demonstraram que todos os oócitos, independente de sua qualidade, possuem proteínas pró e anti-apotóticas e que estas são mantidas nos embriões até a AGE (JURISICOVA et al., 1998; MEIRELLES et al., 2003; OPIELA et al., 2008; VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003). Embora tenha sido demonstrado que em oócitos e embriões de má qualidade a razão Bax/Bcl-2 é maior que naqueles de boa qualidade existem controvérsias, argumentando que esta razão independe da qualidade (MEIRELLES et al., 2004; OPIELA et al.; 2008; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002).

Como já descrito, vários estudos verificaram uma maior expressão de genes em embriões com alta taxa de bloqueio quando comparados a embriões com baixa taxa de bloqueio, incluindo genes vinculados a vias de sinalização de MCP (DODE et al., 2006; FAVETTA et al., 2007; 2004; FIGUEIREDO, 2005; JEONG et al., 2006; MATWEE; BETTS; KING, 2000; MEIRELLES et al., 2004). Devido à ocorrência de apoptose espontânea apenas após a AGE em embriões bovinos, este bloqueio do desenvolvimento parece ser um mecanismo ativo, baseado no balanceamento entre proteínas pró e anti-apotóticas, mas não envolvendo os membros da família Bcl-2 (BADR et al., 2007; FABIAN et al., 2007; GJORRET et al., 2003; JURISICOVA et al., 1998; MATWEE; BETTS; KING, 2000; MEIRELLES et al., 2004; OPIELA et al., 2008; YANG & RAJAMAHENDRAN, 2002).

2.5 Metodologias de estudo na embriogênese

Recentemente, o uso de arranjos de DNA demonstra grande importância para a detecção e quantificação da expressão gênica em larga escala (HARRINGTON; ROSENOW; RETIEF, 2000). Contudo, a quantidade média de mRNA em cada embrião 8 células em camundongo é aproximadamente 0,44 pg (PIKÓ; CLEGG, 1982). Para a elucidação de vias de sinalização envolvidas em diversos eventos associados ao período de pré-implantação e à embriogênese, são utilizados os arranjos de DNA associados a métodos de amplificação, com o objetivo de obtenção de material genético suficiente às hibridizações e validações necessárias, especialmente por PCR Tempo Real (ADJAYE et al., 2007; ARONOW; RICHARDSON; HANDWERGER, 2001; CHEN et al., 2005; ELLESTAD et al., 2006; FAIR et al., 2007; GINSBERG, 2005; GOMES et al., 2003; JENSON et al., 2003; JEONG et al., 2006; JONES et al., 2008; KATO et al., 2007; LI; CUI; KIM, 2006; MAMO et al., 2006a, 2006b; MISIRLIOGLU et al., 2006; PATEL et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2004; SIRARD et al., 2005; STOYANOVA et al., 2004; ZHU; XU; BABA, 2006). Alguns trabalhos referem-se a hibridizações entre diferentes espécies (ADJAYE et al., 2004; DALBIÈS-TRAN e MERMILLOD, 2003; SIQUEIRA et al., 2004; VALLÉE et al., 2006), mostrando a viabilidade e a reprodutibilidade deste tipo de experimento. Basicamente foram desenvolvidas duas estratégias para obtenção de concentrações superiores de RNA. Os métodos baseados em PCR, embora eficientes para gerar RNA amplificado em abundância, têm a propensão de distorcer os dados de expressão devido à amplificação preferencial de transcritos específicos. A outra estratégia envolve a amplificação linear do RNA antisense (aRNA) pela transcrição *in vitro* com RNA polimerase T7, inicialmente descrita por Van Gelder e colaboradores (1990) e posteriormente repetida por outros laboratórios (ELLESTAD et al., 2006; GINSBERG, 2005; JENSON et al., 2003; JEONG et al., 2006; MAMO et al., 2006a; WADENBÄCK et al., 2005; WANG E. et al., 2000).

A taxa de multiplicação linear do aRNA utilizando enzima RNA polimerase T7 mostra resultados extremamente variáveis, dependendo da concentração inicial das amostras e do uso de protocolos modificados. Na descrição do método, foi obtido apenas 3 a 5 vezes de multiplicação em uma única etapa, mas com modificações, esta taxa passou para 15 vezes a até 2.500 vezes em uma única etapa (BAUGH et al., 2001; DONNISON; PFEFFER, 2004; EBERWINE, 1996; GINSBERG et al., 2005; GOMES et al., 2003; JENSON et al., 2003; MOLL; DUSCHL; RICHTER, 2004; PHILLIPPS; EBERWINE, 1996; SCHNEIDER et al., 2004; VAN GELDER et al., 1990; WANG E. et al., 2000; WANG, 2005; ZHU; XU; BABA, 2006).

Os arranjos de DNA são constituídos de um suporte sólido (membranas de *nylon* ou lâminas de vidro) onde os DNAs alvo são depositados de maneira ordenada. Os arranjos

são expostos para hibridização com uma população de moléculas de DNA complementar (cDNA) marcadas com fluoróforos ou isótopos radioativos em uma reação de transcrição reversa. O sinal produzido pela ligação entre o DNA alvo e o mRNA testado reflete a concentração e a presença deste mRNA na população estudada. Os arranjos de DNA podem ser diferenciados por três características: o tipo de suporte empregado, o método de detecção (fluorescente ou radioativo) e o número de genes depositados para análise (CAUSTON; QUACKENBUSH; BRAZMA, 2003; PASSOS; NGUYEN; JORDAN, 2000). A figura 9 representa um esquema de confecção de membranas de *nylon* e do preparo de sondas com marcação radioativa utilizando fósforo 33 (^{33}P). Nessa aplicação, os clones de cDNAs ou produtos de PCR são depositados na membrana por um robô automático. As sondas são preparadas a partir dos mRNAs ou do RNA total, submetidos à transcriptase reversa e marcação radioativa simultânea dos cDNAs resultantes.



Figura 9. Esquema da confecção de membranas de macro arranjo e preparo de sondas radioativas para análise dos transcritos. Fonte: adaptado de Passos, Nguyen, Jordan, 2000.

Vários trabalhos comparando hibridizações em arranjos entre aRNA e RNA total mostraram a reprodutibilidade e a fidelidade dos resultados devido aos altos índices de correlação entre RNA amplificado e RNA total, que variaram entre 0,796 e 0,85 (ELLESTAD et al., 2006; GOMES et al., 2003; PATEL et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2004; STOYANOVA et al., 2004; ZHU; XU; BABA, 2006). Já quando comparadas hibridizações com RNA amplificado em apenas uma etapa e aqueles em duas etapas, foi observado um coeficiente de correlação de 0,85 (PARK et al., 2004).

Contudo, foi detectado um aumento de até 2,5 vezes no número de genes diferencialmente expressos nas amostras submetidas à amplificação do RNA, em relação à RNA total, sugerindo um aumento do ruído no micro arranjo (LI et al., 2004; PATEL et al., 2005). Apesar disso, existem controvérsias a respeito de que estes erros inerentes ao processo não afetem significativamente a estimativa das taxas de expressão gênica em estudos com PCR Tempo Real, com estudos encontrando uma mudança de nível de expressão maior que 2 vezes após a amplificação do RNA em menos de 3,5% dos genes identificados (STOYANOVA et al., 2004; ZHU; XU; BABA, 2006). A escolha do gene endógeno para estudos de PCR em tempo real na embriogênese também é de suma importância. Devido à característica inerente de variação nas quantidades de mRNA nos estádios de pré-implantação, vários grupos de pesquisa vêm buscando uma melhor alternativa na escolha do gene endógeno (BALASUBRAMANIAN et al., 2007; BUSTIN, 2002; GOOSSENS et al., 2007, 2005; MISIRLIOGLU et al. 2006; ROBERT et al., 2002; VIGNEAULT et al., 2007).

Apesar destas constatações, os resultados obtidos indicam que o uso de RNA antisense amplificado mostrou ser um protocolo adequado à hibridização quando a amostra biológica for escassa, obtendo resultados satisfatórios em micro arranjos coconfirmados por análise da expressão gênica por PCR quantitativo em Tempo Real (ELLESTAD et al., 2006; JENSON et al., 2003; LI et al., 2004; MAMO et al., 2006a; PARK et al., 2004; STOYANOVA et al., 2004; ZHU; XU; BABA, 2006).

3. HIPÓTESE

Hipótese geral

O bloqueio do desenvolvimento no estágio de oito células em embriões bovinos, concomitante à ativação do genoma neste embrião, associado aos achados de ocorrência de apoptose espontânea ou induzida apenas após esta ativação do genoma levou à formulação da hipótese de que o bloqueio está relacionado a um mecanismo ativo de sinalização para a morte celular programada em embriões com baixa competência ao desenvolvimento.

Hipóteses específicas

- A utilização da metodologia genômica auxiliará na identificação dos genes envolvidos no processo de MCP e sobrevivência celular;
- Há ativação do genoma embrionário no momento do bloqueio do desenvolvimento;
- Os embriões bovinos que sofrem bloqueio utilizam uma via de sinalização diferente daquela do Bax e do Bcl-2 para induzir a morte celular programada.

4. OBJETIVO

Objetivo geral

Tendo em vista o exposto anteriormente, este trabalho visou determinar quais genes estão envolvidos no processo da morte celular programada no momento do bloqueio embrionário em embriões bovinos de desenvolvimento rápido (8 células às 48 horas pós-inseminação e alto potencial de desenvolvimento a blastocisto - R8) e lento (8 células às 90 hpi e alta taxa de bloqueio – L8).

Objetivos específicos

- Identificação de moléculas de mRNA com regulação diferencial entre embriões bovinos dos grupos R8 e L8 obtidas por macro arranjos de cDNA;
- Avaliação da regulação de alguns genes associados ao bloqueio celular em embriões dos grupos R8 e L8 por PCR em Tempo Real;
- Identificação das possíveis vias de sinalização de MCP ou sobrevivência celular que podem ocorrer em embriões R8 e L8 por mapas de regulação gênica.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido, em sua maioria, no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), da Universidade de São Paulo – Campus de Pirassununga, exceto a hibridização das membranas contendo clones de cDNAs humanos e a análise estatística das membranas, ambas realizadas no Laboratório de Imunogenética Molecular, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), da Universidade de São Paulo, sob coordenação do Prof. Dr. Geraldo Aleixo S. Passos Júnior.

5.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV)

Coleta dos ovários e seleção dos oócitos

Ovários de vacas zebus ou azebuadas foram obtidos de abatedouros, transportados em solução salina (0,9%) a 37°C e encaminhados até o laboratório. Os COCs foram aspirados de folículos entre 2 e 8 mm utilizando seringa de 10 mL acoplada a uma agulha de 18 G. Somente os COCs com *cumulus* compacto completo, citoplasma sem granulações e de aspecto homogêneo foram utilizados (Grau I).

Maturação *in vitro* (MIV)

Os COCs foram maturados em meio TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃ suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), piruvato (22 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL) e 0,5 µg de FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1 µg de estradiol/mL. Os COCs foram depositados em microgotas de 100 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral e levados à incubadora a 38,5°C, 5% CO₂ em ar e com máxima umidade, durante 22-24 horas.

Fecundação dos oócitos *in vitro* (FIV)

Após o período de maturação, os oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro*, em microgotas de 90 µl de meio TALP suplementado com heparina (10 µg/mL), piruvato (22 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), BSA sem ácidos graxos (6 mg/mL) e solução de PHE (2 µM de penicilamina, 1 µM de hipotaurina e 0,25 µM de epinefrina). As palhetas de sêmen de touros da raça Nelore foram descongeladas em banho-maria a 35°C, durante 30 segundos e seu conteúdo foi centrifugado em gradiente de Percoll (45 e 90%) para obtenção dos espermatozóides móveis, além da remoção do diluidor e do plasma seminal. A concentração espermática foi de 2×10^6 células/mL e, após 30 minutos de incubação dos espermatozóides, os oócitos foram transferidos para as microgotas (20-30 oócitos/gota) onde permaneceram sob incubação em atmosfera com 5% de CO₂ em ar a 38,5°C, durante aproximadamente 12 horas.

Cultivo dos embriões *in vitro* (CIV)

Após o processo de MIV e FIV, os zigotos foram co-cultivados *in vitro* em meio CR2 modificado suplementado com 10% SFB e 30 mg BSA/mL e em co-cultivo com células da granulosa (WATANABE, 1998). Decorridas 48 e 90 horas pós-inseminação (hpi) a taxa de clivagem foi avaliada e houve renovação do meio de cultivo (*feeding*). Nesta etapa, os embriões foram separados, respectivamente, nos grupos R8 e L8, sendo grupo R8 aqueles que atingiram o 4º ciclo celular às 48 horas pós-inseminação (desenvolvimento rápido) e grupo L8 aqueles que atingiram o mesmo ciclo celular entre 48 e 90 hpi (desenvolvimento lento). Os embriões destinados à extração do mRNA com posterior hibridação foram congelados em nitrogênio líquido, em menor volume possível de meio de cultivo e acondicionados a -80°C. Aqueles destinados à validação por PCR em Tempo Real foram lavados inicialmente em gotas de PBS sem Cálcio e Magnésio adicionado de 0.1% de PVP pré-aquecida a 37°C. Em seguida, passaram por gotas de hialuronidase 2% também pré-aquecidas a 37°C. Os embriões foram separados em grupos de 10 unidades e lavados em RNA *later* (Qiagen), sendo imediatamente colocados em microtubos com 1 µL de Trizol (Invitrogen) e armazenados a -80°C até o momento de extração do RNA total.

O processo de PIV, desde a coleta dos oócitos até a obtenção de embriões no estágio de 8 células, está ilustrado na figura 10.

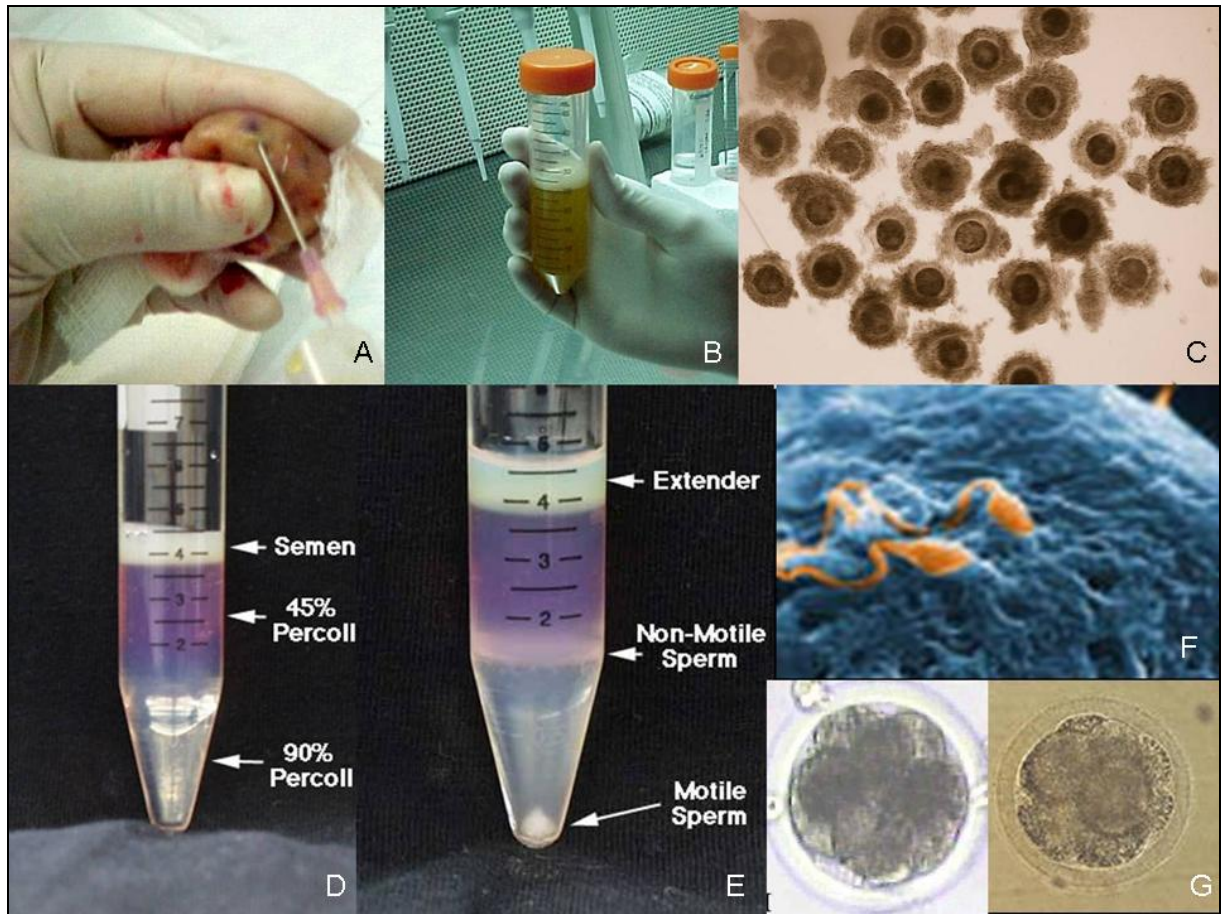


Figura 10. Ilustração das diferentes etapas do processo de produção *in vitro* de embriões bovinos. A – Aspiração dos folículos ovarianos; B – Obtenção do líquido folicular; C – COCs selecionados; D – Preparação do gradiente de Percoll; E – Seleção dos espermatozoides viáveis; F- Fecundação *in vitro*; G - Embriões no estágio de 8 células.

5.2 Análise da regulação gênica por hibridação em membranas de arranjo

5.2.1 Extração do RNA mensageiro (mRNA)

Para extração do mRNA foram utilizados materiais livres de RNase, submetidos à luz UV por 15 minutos. A água utilizada foi submetida a tratamento, que inclui DEPC 0,1% e filtração. Grupos com 50 embriões recém clivados e com exatamente 8 células foram formados com embriões dos grupos de desenvolvimento rápido (R8) e lento (L8). A extração do mRNA foi feita com o *QuickPrep Micro mRNA Purification Kit* (Amersham Biosciences). Resumidamente, o protocolo consistiu em adicionar 400 µL de tampão de extração e 800 µL de tampão de eluição a um grupo de 50 embriões, seguidos por centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi retirado e adicionado a um precipitado de Oligo dT celulose, seguido por nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 segundos. Foram realizadas 5 lavagens do precipitado, cada uma com 1 mL de tampão de alta concentração salina e centrifugação a 14.000 rpm por 10 segundos. Em seguida, foram realizadas duas lavagens em 1 mL de tampão de baixa concentração salina, com centrifugação a 14.000 rpm por 10 segundos. Após a última lavagem, foram adicionados 300 µL deste tampão de baixa concentração salina ao precipitado, homogeneizado e transferido à coluna, que foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 segundos com descarte do eluído. Foram então realizadas 3 lavagens da coluna, cada uma com 500 µL de tampão de baixa concentração salina e centrifugação a 14.000 rpm por 5 segundos, com descarte do eluído. A coluna foi removida do tubo e transferida para outro tubo, onde foram adicionados, por duas vezes, 200 µL de tampão de eluição pré-aquecido a 65°C e centrifugada a 14.000 rpm por 5 segundos. Ao eluído foram adicionados 10 µL de solução de glicogênio, 40 µL de solução de acetato de potássio e 1 mL de etanol 95% a -20°C, sendo o tubo acondicionado nesta temperatura por no mínimo 30 minutos, a fim de precipitação do mRNA. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C, e o mRNA foi eluído em 10 µL de água livre de RNase.

5.2.2 Amplificação do RNA antisense (aRNA)

Para a amplificação linear do RNA foi empregado o método de amplificação do aRNA com utilização do *MessageAmp aRNA Kit* (Ambion), a fim de viabilizar os trabalhos posteriores de hibridação.

Obtenção do cDNA fita dupla

O mRNA extraído (RNA senso – 5´- 3´) a partir de um *pool* de 50 embriões no estágio de 8 células foi utilizado para a reação da transcriptase reversa para obtenção do cDNA fita dupla. Nesta etapa, foi utilizado o *MessageAmp aRNA Kit* (Ambion). Ao mRNA, foi adicionado 1 µL de iniciador Oligo (dT)- T7 e 1 µL de água DEPC, para um volume final de 12 µL. A reação foi incubada a 70°C por 10 minutos, e a ela foi adicionado um *Máster Mix* contendo 2 µL de Tampão 10X de Primeira Fita, 1 µL de Inibidor de Ribonuclease, 4 µL de dNTP e 1 µL de Transcriptase Reversa, totalizando 20 µL. A reação completa foi incubada a 42°C por 2 horas e em seguida colocada em gelo.

Após a síntese da primeira fita (fita anti-senso – 3´- 5´), procedeu-se imediatamente a síntese da segunda fita de cDNA (fita senso), adicionando-se ao tubo de reação 10 µL de Tampão 10X de Segunda Fita, 4 µL de dNTP, 2 µL de DNA polimerase, 1 µL de RNase H e 63 µL de água DEPC, a fim de completar 100 µL. Esta reação foi incubada a 16°C por 2 horas.

Em seguida, foi feita a purificação do cDNA dupla fita, adicionando uma coluna de purificação ao tubo de reação, associado a lavagens em 300 µL de tampão de ligação e 500 µL de tampão de lavagem, seguidos por centrifugações a 10.000 rpm por 1 minuto e adição de 20 µL de água DEPC pré-aquecida a 50°C ao filtro, com posterior centrifugação a 10.000 rpm por 90 segundos para recuperação do cDNA. Este foi eluído em 16 µL de água DEPC.

Transcrição *in vitro* do aRNA

A transcrição *in vitro* do aRNA foi realizada a partir da dupla fita de cDNA, utilizando como molde a segunda fita de cDNA (fita senso), que tem a mesma sequência do RNA mensageiro original. Na transcrição, aos 16 µL do cDNA dupla fita foram adicionados 4 µL de T7 ATP, 4µL de T7 CTP, 4 µL de T7 GTP, 4 µL de T7 UTP, 4 µL de T7 Tampão de Reação 10X e 4 µL de enzima T7 RNA polimerase, totalizando um volume de 40 µL. Esta

reação foi incubada a 37°C por 14 horas. Em seguida, o volume foi elevado a 100 µL pela adição de Solução de Eluição.

Finalmente, procedeu-se a purificação do aRNA, adicionando ao tubo de reação 350 µL de tampão de ligação, 250 µL de etanol 100% e 650 µL de tampão de lavagem, seguidos por centrifugações a 10.000 rpm por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 100 µL de água DEPC ou em solução de eluição, pré-aquecida a 50°C ao filtro, com posterior centrifugação a 10.000 rpm por 90 segundos. O aRNA foi eluído em volume de 100 µL em água DEPC e submetido a uma segunda fase de amplificação, para aumentar a concentração de aRNA na amostra. Nesta segunda fase, o aRNA com cauda poli U foi utilizado como molde para produção da dupla fita de cDNA, utilizando 2 µL de iniciadores de segunda etapa para síntese da primeira fita e iniciador Oligo (dT)- T7 para síntese da segunda fita do cDNA. A partir do cDNA dupla fita é sintetizada uma nova fita de aRNA, segundo metodologia já descrita. Os passos de produção do aRNA estão sumarizados na figura 11.

Para que fosse realizada a hibridação em arranjos, as amostras de aRNA, já amplificadas em duas etapas necessitaram de uma nova fase de amplificação para a obtenção de concentração suficiente de amostra para a hibridação nas membranas de macro arranjo. Esta terceira fase é similar à segunda etapa de amplificação, anteriormente descrita. Em seguida, as amostras foram concentradas em centrífuga a vácuo.

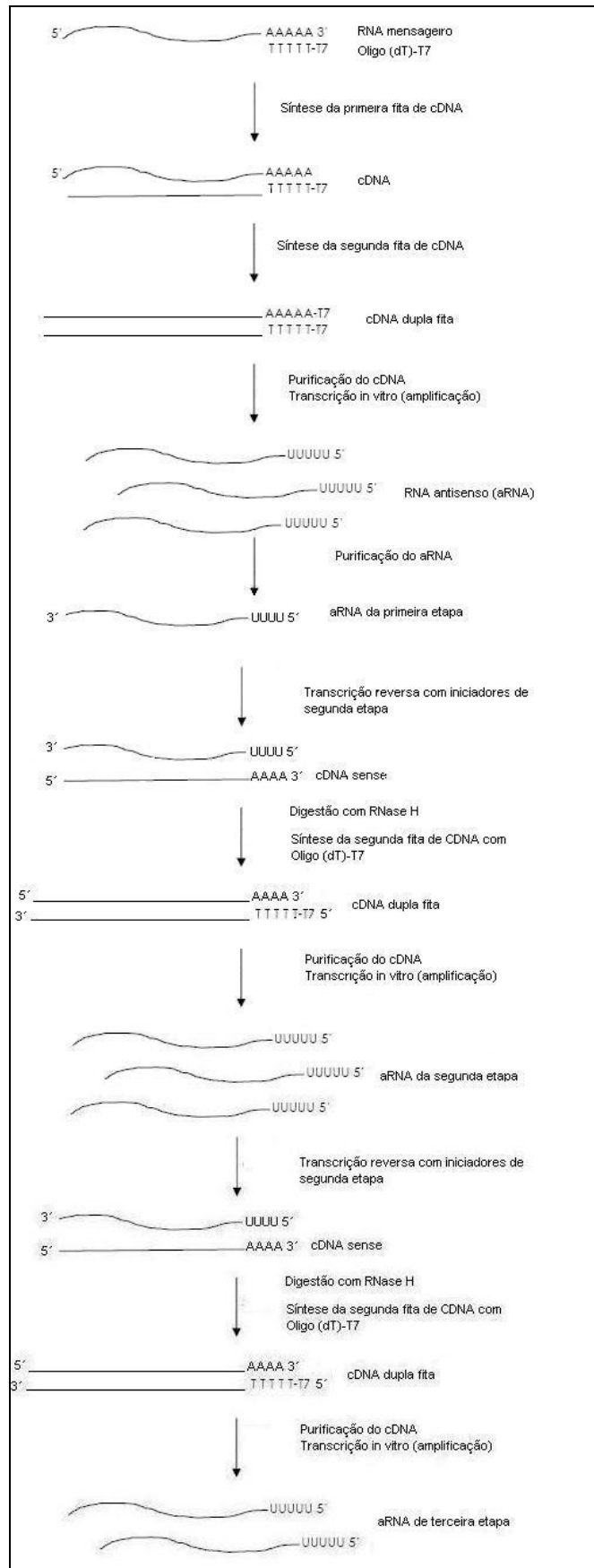


Figura 11. Passos para a produção de cDNA dupla fita e amplificação do aRNA em três fases de amplificação.

5.2.3 Hibridação das membranas (*macroarrays*)

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Imunogenética Molecular, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), da Universidade de São Paulo, sob coordenação do Prof. Dr. Geraldo Aleixo S. Passos Júnior.

Confecção e tratamento das membranas do arranjo

Para este experimento foram utilizadas membranas de *nylon* 2,5 x 7,5 cm (Amersham Biosciences) contendo clones de genes humanos relacionados ao ciclo celular e produzidas no Laboratório de Imunogenética Molecular. A deposição dos clones foi realizada pelo equipamento *Generation III MicroArray Spotter* (Amersham Molecular Dynamics, USA). As membranas de *nylon* Hybond N+ foram fixadas em lâmina de vidro, sendo que em cada uma foram depositados 936 pontos únicos em duplicata, num total de 1872 clones (Figura 12). Dos 936 pontos, 156 são controles de qualidade distribuídos na membrana e 780 são clones provenientes da biblioteca humana de cDNAs oriunda de vários tecidos, obtida do Consórcio IMAGE (Integrated **M**olecular **A**nalysis of **G**enomes and their **E**xpression Consortium's), gentilmente disponibilizada pelo Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos Júnior e pela Dra. Catherine Nguyen do *Centre d'Immunologie Marseille-Luminy*, INSERM-CNRS, Marseille, França.

O tratamento das membranas foi feito um dia após a deposição dos clones, com a colocação destas sobre papel umedecido com solução de desnaturação preparada a fresco (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) por 20 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram transferidas sobre o papel umedecido em solução de neutralização (Tris HCl 1 M pH 7,4, NaCl 1,5 M) por mais 20 minutos, sendo posteriormente lavadas em solução 2x SSC (solução salina com citrato de sódio) e secas sobre papel de filtro (Whatman, Maidstone, UK) e transferidas para forno a 80 ° C por 2 horas. Em seguida, foi realizado o *crosslinker* por 90 segundos sob a luz UV. As membranas foram estocadas em embalagens plásticas, à temperatura ambiente.



Figura 12. Deposição dos clones em membranas de *nylon* pelo equipamento *Generation III MicroArray Spotter*.

Hibridação das membranas com sonda oligo-vetor

A hibridação com a sonda oligo-vetor LBP 9 tem o objetivo de determinar a quantidade exata de cDNA retido em cada ponto do arranjo e a qualidade da espotagem. Este oligonucleotídeo foi desenhado para hibridar-se a uma região consenso aos três vetores utilizados para clonagem dos cDNAs presentes na biblioteca IMAGE. As membranas foram transferidas para um frasco de hibridação e umedecidas em 2x SSC. Em seguida, foram acrescentados 4mL de tampão de pré-hibridação (5x SSC, 5x Denhardt's, 0,5% SDS - dodecil sulfato de sódio) pré-aquecido a 65 ° C e 100 µg/mL (concentração final) de DNA de esperma de salmão. As membranas foram incubadas *overnight* a 65° C, em forno de hibridação.

Após a pré-hibridação, a sonda oligo-vetor foi marcada utilizando 1 µL da solução de oligonucleotídeo LBP 9 (1 µg/mL) com seqüência específica para o vetor, 4 µL de tampão 5x para T4 quinase, 1 µL da enzima T4 quinase (Invitrogen), 3 µL de γ ³³P ATP 5000 Ci/mM (Amersham Biosciences) e água ultrapura para volume final de 20 µL. A sonda foi incubada por 45 minutos a 37 °C. Em seguida, foram acrescentados 80 µL de água ultrapura e realizada a purificação da sonda oligo-vetor.

A purificação das sondas em coluna tem a função de retirar o fósforo radioativo não incorporado na reação. A sonda foi purificada em coluna de Sephadex G50. A incorporação do fósforo radioativo foi quantificada em leitor de cintilografia líquida (TriCarb, Packard), utilizando 200.000 cpm por mL de tampão de hibridação. Após a purificação do oligo-vetor, 1 µL deste foi adicionado ao frasco de hibridação e incubado a 65°C por 48 horas.

Após a hibridação, a lavagem das membranas foi efetuada em 50 mL de solução contendo 2x SSC/0,1% SDS. As membranas foram mantidas nesta solução durante 10 minutos, à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas a 42 °C por 5 minutos. Após essa lavagem, as membranas foram retiradas da solução e colocadas em recipientes com 2x SSC para remoção de quaisquer impurezas, e colocadas sobre papel filtro (Whatman, Maidstone, UK).

Após a secagem, as membranas foram expostas contra uma placa sensível à radiação por 72 horas, sendo os sinais de hibridação capturados pelo leitor *Phosphor imager* (Cyclone, Packard Instruments, USA), e quantificados pelo programa *OptiQuant* (Packard Instruments, USA). A visualização das imagens permitiu verificar a espotagem de qualidade adequada nas membranas. Assim, todas as membranas mostraram-se adequadas para a hibridação com sonda (Figura 13).

Para a retirada dos sinais de hibridação com a sonda oligo-vetor, as membranas foram lavadas por 3 horas em 300 mL de 0,1X SSC/0,2% SDS a 68°C, e em seguida lavadas em 2x SSC, para retirada da marcação com oligo-vetor. As membranas foram novamente expostas a uma placa sensível por 24 horas e a eficiência na remoção da marcação foi avaliada no leitor *Phosphor imager* (Cyclone, Packard Instruments, USA).

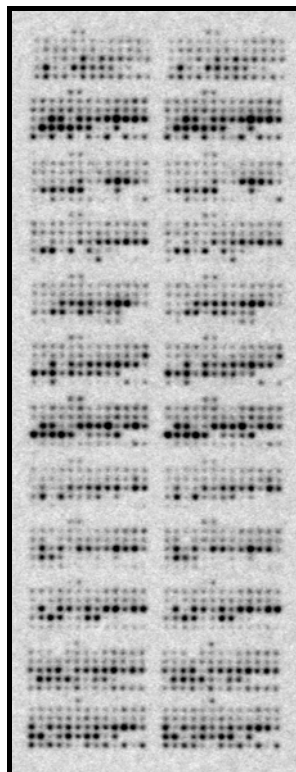


Figura 13. Membrana de arranjos de cDNA hibridada com sonda oligo-vetor. Cada ponto equivale a um clone, sendo que a coluna da direita é réplica da coluna da esquerda, tendo sido consideradas como repetições neste experimento.

Hibridação das membranas com sonda de cDNA embrionário

As membranas foram lavadas em 2x SSC, secas e dispostas em grupos de três em garrafas de hibridação, na quais foram acrescentadas 3mL de solução de pré-hibridação (5x SSC, 5xDenhardt's, 0,5% SDS, 1 mL de DNA de esperma de salmão em 50 mL de tampão de pré-hibridação; concentração final 10 mg/mL) pré-aquecida a 65°C e filtrada. As garrafas foram vedadas e colocadas no forno de hibridação a 65°C, *overnight*.

A etapa de marcação das sondas sofreu algumas modificações em relação ao protocolo comumente utilizado no laboratório devido ao fato de ser utilizado aRNA (portanto, com cauda poli U), ao invés de mRNA. Assim, houve substituição dos iniciadores da reação do Oligo dT para iniciadores randômicos

Após a pré-hibridação, foram separados 15 µg de RNA de cada grupo embrionário (L8 e R8) para confecção da sonda. Ao aRNA foram adicionados 1 µL de oligonucleotídeo randômico pdN6 (9,6 µg/µL) e 1 µL de oligonucleotídeo randômico do *kit CyScribe cDNA post labelling* (Invitrogen), a fim de maximizar a produção de cDNA. A reação foi incubada no termociclador por 8 minutos a 70°C e 30 minutos a 42°C, com a temperatura caindo a uma taxa de 1°C/minuto entre 70°C e 42°C. Em seguida, foram adicionados por reação 6 µL de tampão 5x BRL (Invitrogen), 2 µL de DTT 0,1M (Invitrogen), 1 µL RNasin 2.500u (Promega), 1 µL Superscript II 10.000u (Invitrogen), 0,6 µL dATG 20 mM (20 mM de dATP, de dTTP, de dGTP), 0,6 µL dCTP 120 µM, totalizando um volume de 25,7 µL por tubo, dentro do termociclador a 42°C. Os tubos foram levados à sala preparada para uso de material radioativo, onde foram adicionados 6 µL de α ³³P dCTP 10 µCi/µL (Amersham Biosciences). As reações foram incubadas em banho-maria a 42°C por 1 hora, quando então foi acrescentado mais 1 µL de Superscript II 10.000u (Invitrogen) por reação, e incubadas por mais 1 hora a 42°C no banho-maria.

Para a degradação dos RNAs restantes e obtenção de sonda fita simples, a cada reação foram acrescentados 1 µL de SDS 10%, 1 µL de EDTA 0,5M e 3 µL de NaOH 3M, e a sonda foi incubada por 30 minutos a 68°C no banho-maria e 15 minutos à temperatura ambiente. Para a neutralização do NaOH, foram adicionados à reação 10 µL Tris 1M, 3 µL HCl 2N, água ultrapura DEPC para um volume final de 100 µL.

As sondas foram purificadas transferindo-se todo o volume para uma coluna Sephadex G50 e esta foi centrifugada por 4 minutos a 1.000 rpm e o eluído recuperado. Do volume total do eluído, 1 µL foi reservado para leitura no cintilador (TriCarb, Packard). Ao restante da sonda eluída, foi adicionado 2 µL de A80 (1 µg/µL), e desnaturada por 5 minutos a 100°C. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão de hibridação pré-aquecido a 65°C e incubado por 2 horas e 30 minutos a 65°C no banho-maria. Durante a incubação, a

sonda reservada para quantificação em leitor de cintilografia líquida foi diluída em 5 mL de líquido do cintilador, e foi avaliada a taxa de incorporação da sonda.

Após a purificação da sonda, 1 μ L desta foi adicionada ao tampão de hibridação, e a garrafa contendo as membranas foi vedada e levada ao forno de hibridação a 65°C por 48 horas. As membranas foram retiradas da garrafa com auxílio de pinça e colocadas em recipientes contendo cerca de 50 mL de solução de lavagem. Neste caso, optou-se por realizar uma lavagem inicial de baixa estringência à temperatura ambiente (2x SSC/0,1% SDS), com verificação no contador Geiger do nível de radioatividade das membranas após cada lavagem, a fim de evitar uma possível perda da marcação da sonda. O recipiente foi colocado em agitação contínua inicialmente à temperatura ambiente por 5 minutos, seguido de lavagem em 2x SSC/0,1% SDS a 42°C por 5 minutos e lavagem em maior estringência de sal (0,5x SSC/0,01% SDS) a 42°C por mais 5 minutos, seguidas de lavagem a 2X SSC/0,1% SDS a 65°C por 10 minutos. O aumento de estringência foi acompanhado pela verificação da radioatividade no contador Geiger. As membranas foram lavadas em 2x SSC para remoção de quaisquer impurezas e secas, sendo colocadas sobre papel filtro (Whatman, Maidstone, UK).

As membranas secas foram expostas contra uma placa sensível à radiação por pelo menos uma semana. Após este período, foi utilizado um leitor de captura dos sinais de hibridação *Phosphor imager* (Cyclone, Packard Instruments, USA), com uso do programa *OptiQuant* (Packard Instruments, USA).

Análise dos resultados da hibridação

Filtragem e Normalização nas membranas

As imagens digitalizadas foram processadas no programa *Image Gauge* v3.12 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) e avaliadas pelo *Array Gauge* v1.1 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan), onde foram estabelecidas as grades de espotagem e a subtração do *background* global, de acordo com instruções do fabricante (Figura 14).

Os dados de marcação, extraídos das membranas pelo programa *Array Gauge* v1.1 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) foram transportados para o *Microsoft Excel 2000* (Microsoft, USA), onde foi feita a filtragem dos dados, com retirada de valores negativos após a subtração do *background* e também a retirada dos *outliers*, com limite máximo de 20% das amostras a serem excluídas. Para esta exclusão de dados, os dados brutos de marcação de cada grupo experimental (R8 e L8) foram agrupados e foi obtida uma mediana na horizontal, para cada gene, dentro de cada grupo experimental. Os dados foram, então, divididos pela mediana específica de cada gene. Para a seleção dos dados discrepantes

(*outliers*), optou-se por excluir aqueles que apresentaram razões entre os valores de hibridação dentro de cada grupo experimental maiores que 3 vezes, portanto, 3 desvios-padrões acima ou abaixo da mediana para aquele gene, a fim de compreender 99,7% dos pontos apresentados. Em seguida, foi realizada a normalização vertical, para permitir a comparação de dados de regulação diferencial de diferentes replicatas. Foram calculadas as medianas dos valores brutos por replicata, já sem os *outliers*.

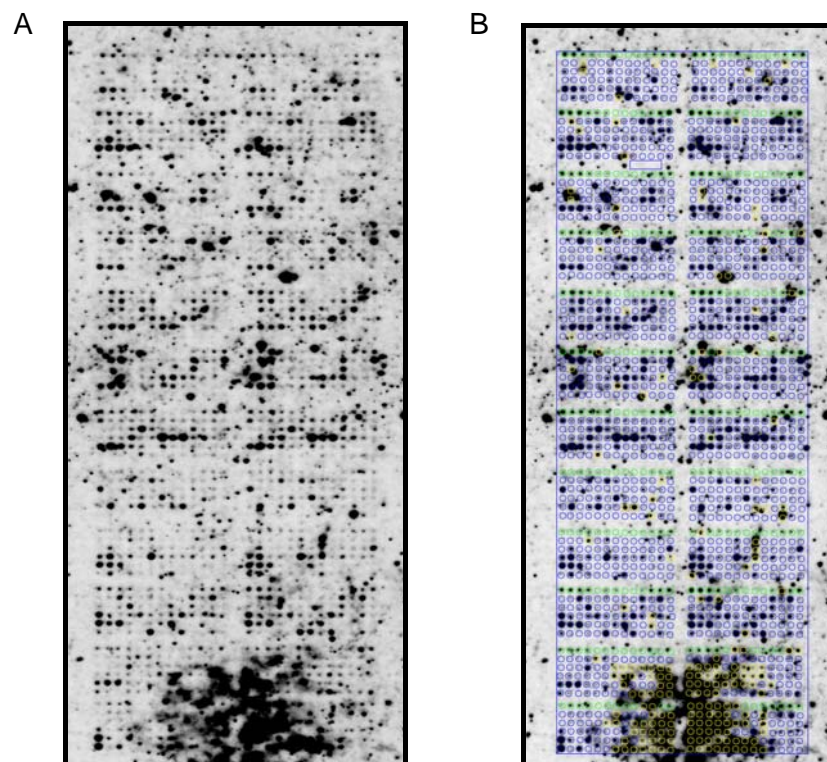


Figura 14. Membrana de arranjos de cDNA hibridada com sonda marcada. Em A, membrana sem as grades de espotagem; em B, membrana com as grades de espotagem (pontos em azul). Os pontos em verde representam os controles de qualidade da membrana e os pontos em amarelo são pontos excluídos em análise visual devido ao *background*.

Os valores brutos foram divididos pela mediana de cada repetição, e, a partir destes novos valores normalizados, foram calculadas novas medianas (que devem ser iguais a 1), médias, valores máximos, mínimos, primeiros e terceiros quartis e desvio padrão para cada repetição, de cada grupo de embriões. Estes padrões foram utilizados para configuração de gráficos diagnósticos para avaliação dos procedimentos adotados.

Análise estatística e de clusterização nas membranas

Após os procedimentos de filtragem e normalização, os dados normalizados foram exportados para o programa *TIGR MeV: MultiExperiment Viewer*, versão 4.0 (TIGR), disponível no endereço eletrônico <http://www.tm4.org/mev.html>. Foi utilizada inicialmente a ferramenta *Percentage Cutoff* no valor de 80%, para ignorar os genes que não apresentaram resultado em pelo menos 80% das amostras. Os dados foram submetidos à análise estatística pelo teste SAM (*Significance Analysis for Microarrays*), que se baseia em uma série de testes-t específicos para cada gene, adaptados para a detecção em larga escala de genes diferencialmente modulados. A partir da observação de que as flutuações casuais são específicas para cada gene, o teste SAM é baseado na razão entre a diferença das médias das situações dos grupos experimentais (neste caso, grupos rápido e lento) e o desvio padrão para cada gene, calculados a partir das repetições. É uma ferramenta útil quando há uma hipótese *a-priori* de que alguns genes têm níveis de regulação média significativamente diferentes entre as amostras biológicas. A porcentagem de genes identificados por mudanças aleatórias é a denominada FDR (*False Discovery Rate*), definida como a proporção esperada de rejeições falsas, ou seja, a proporção de genes provavelmente identificados ao acaso como sendo significativos. Neste trabalho, adotou-se o FDR menor ou igual a 0,05. Em seguida foi aplicada a ferramenta HCL (*Hierarchical Clustering*), que agrupa os genes de acordo com o perfil de expressão pela distância euclidiana.

Para a determinação dos genes com mudanças significativas na regulação gênica, foi utilizado um gráfico de dispersão de diferença relativa observada ($d(i)$) versus diferença relativa esperada ($d_E(i)$). Para a maioria dos genes, estes valores são semelhantes, mas outros estão distantes da linha de igualdade. Assim, as alterações na modulação dos genes que se encontram a uma distância maior que o limiar de Delta (Δ) são consideradas significativas. Este limiar Δ determina dois cortes horizontais para que um gene seja considerado significativo. O cálculo de FDR e o número de genes com mudanças significativas estão relacionados ao limiar Δ , pois se o Δ diminui, o número de genes alterados aumenta e o FDR também aumenta. O limiar Δ pode ser escolhido com base no nível de significância estimada pelo FDR e no número de genes com os quais se pretende trabalhar.

Na ferramenta SAM foi calculado também o *q-value*, que é uma determinação para cada gene do menor FDR, no qual o valor do diferencial de modulação daquele gene é chamado de significativo. Este fator é conhecido como valor *p*, adaptado para a análise de

um grande número de genes. O *q-value* mede a significância do diferencial de regulação para um determinado gene e aqueles que apresentaram um *q-value* menor ou igual a 0,05 (5%) foram considerados diferencialmente modulados. O desenho do SAM escolhido foi o *two-class unpaired*, na qual a amostra é classificada em apenas um de dois grupos, tendo os dois grupos distintos. Os genes são significativamente positivos se a regulação média do grupo A for maior que a do grupo B e vice-versa. Assim, foram detectados os genes modulados positivamente em L8 em relação a R8 e também embriões com modulação negativa nesta mesma comparação, com FDR e *q-value* menores ou iguais a 0,05.

Categorização das seqüências

As informações a respeito das funções moleculares dos genes modulados negativamente e positivamente em embriões L8 em relação a R8 foram obtidas pelo seu número do clone, situadas no banco de dados SOURCE (Stanford On Line Universal resource for Clones and ESTs), disponível no endereço eletrônico <http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>, e no banco de dados do endereço eletrônico <http://ca.expasy.org/uniprot>. Estes bancos compilam informações de vários bancos de dados, incluindo do *Gene Ontology Consortium*, facilitando a análise de um grande número de gene.

Similaridade dos genes diferencialmente modulados nas membranas

Após a aquisição do número de acesso para o GenBank, as seqüências foram analisadas segundo seu grau de similaridade com dados de seqüências do genoma de *Bos taurus* pela ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) da página do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), no subitem *Nucleotide-Nucleotide BLAST*.

5.3 Análise da modulação gênica por amplificação de genes de interesse

Extração de RNA total e produção do cDNA

O RNA total foi inicialmente extraído de grupos de 5 a 10 embriões por tubo para os testes iniciais de PCR. Posteriormente, foram organizados cinco *pools* contendo 75 embriões R8 e cinco *pools* com 75 embriões L8 cada, totalizando 375 embriões de cada grupo em 5 repetições. Foram produzidos os cDNAs em volume final de 20 μL , e a fim de aumentar o volume para facilitar futuras pipetagens nestes *pools* contendo 75 embriões cada, foram adicionados 70 μL de água ultrapura, totalizando 90 μL de volume final de cDNA por amostra. Para extração do RNA total foram utilizados materiais livres de RNase e água submetida a tratamento, que inclui DEPC 0,1% e filtração. Todos os embriões foram congelados em Trizol (Invitrogen), e acondicionados a -80°C até o momento da extração do RNA total.

Ao grupo de 75 embriões foram adicionados 200 μL de Trizol, com homogeneização por pipetagens vagarosas. A amostra foi repassada para um tubo de *Phase Lock Gel* (Eppendorf), já pré-centrifugado a 12.000 g por 45 segundos para compactação do gel. O tubo foi deixado por 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida foram adicionados 40 μL de clorofórmio, com posterior incubação por mais 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 g em centrífuga refrigerada a 8°C . Nesta etapa, devido ao uso do *Phase Lock Gel*, formaram-se 3 fases, a saber, fase aquosa, fase do gel e fase orgânica. A fase aquosa foi separada em um outro tubo, e a esta foram adicionados 1 μL de glicogênio (5-10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e 100 μL de álcool isopropílico para precipitação do RNA. O tubo foi invertido cerca de 10 vezes e mantido a -20°C por 30 minutos a 1 hora. Este foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 g a 8°C , com descarte de sobrenadante por inversão do tubo. O precipitado foi lavado duas vezes em 200 μL de etanol 75% gelado e centrifugado por 5 minutos, a 8°C a 7.500 g. Em seguida, este foi desidratado à temperatura ambiente por 10 minutos. O RNA foi eluído em 8 μL de água DEPC e incubado no banho seco a 55°C por 10 minutos para eluição. Em seguida, foi acondicionado em gelo para realização da transcrição reversa.

Em seguida, o RNA extraído foi submetido à síntese do cDNA por transcrição reversa seguida de PCR. Nesta etapa foi utilizado o *kit ImProm II Reverse Transcriptase* (Promega). O RNA foi incubado a 70°C por 5 minutos com 1 μL de Oligo dT₁₂₋₁₈ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e imediatamente resfriado a 4°C por 5 minutos para a adição de 4 μL de tampão de reação

5x, 2.4 μL do MgCl_2 25 mM, 1 μL de dNTPs a 10 mM cada, 1 μL de RNaseOUT (1 U/ μL – Invitrogen) e 1 μL de Improm II Reverse Transcriptase, totalizando uma reação de 20 μL . Em seguida, a amostra foi submetida a 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos. Estas foram então armazenadas a -20°C até o momento da utilização para PCR em Tempo Real.

Desenho das seqüências de oligonucleotídeos

Para desenho dos oligonucleotídeos dos genes de interesse foram utilizados os programas *Primer Premier v.5.00* (Biosoft International) e *Primer3*, disponível no endereço eletrônico <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. Os parâmetros de temperatura de anelamento foram considerados aqueles obtidos pela ferramenta *Tm calculator* no endereço eletrônico <http://www.appliedbiosystems.com/support/apptech/>. As seqüências foram analisadas pelo *Cow Blat* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?hgsid=92492514>) e o *In silico PCR* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) para verificação de existência de íntrons na região amplificada pelos oligonucleotídeos.

Os genes escolhidos para estudo e os respectivos números de acesso ao *GenBank* e ao *Unigene Cluster* bovino utilizados para o desenho dos *primers* estão na tabela 1, assim como o gene endógeno escolhido. Para o gene OPCML, quando realizado o alinhamento da seqüência humana presente na membrana do arranjo com o genoma bovino, foram encontradas duas isoformas com similaridade maior que 84% e altos escores. Assim, estão listados os dois números de acesso ao *GenBank* utilizados para desenho do oligonucleotídeo.

Tabela 1. Genes escolhidos para validação em PCR Tempo Real, com respectivos números de acesso ao *GenBank* e do *UniGene Cluster*.

Gene	<i>GenBank</i>	UG Cluster
SFRS 11 (<i>Splicing factor, arginine/serine-rich 11</i>)	NM_001075621	Hs. 479693
BIRC 6 (<i>Baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon)</i>)	XM_613901	Hs. 150107
SOCS 1 (<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>)	XM_864316	Mm. 130
CCL 28 (<i>Chemokine (C-C motif) ligand 28</i>)	XM_615382	Hs. 334633
COL 1A2 (<i>Collagen type I, alpha 2</i>)	NM_174520	Hs. 489142
OPCML (<i>Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like</i>)	NM_174407.2 e BT_026246.1	Hs. 4817
TAF 1B (<i>TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, B, 63kDa</i>)	NM_001075503	Hs. 584833
Survivina (<i>Baculoviral IAP repeat-containing 5</i>)	AY606044	Hs.514527
GAPDH (<i>Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase</i>)	NM_001034034	Bt. 87389

A tabela 2 lista a seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores para o estudo dos genes diferencialmente modulados entre embriões de desenvolvimento rápido e lento, além da seqüência do gene endógeno GAPDH utilizado neste trabalho.

Tabela 2. Seqüências e tamanho dos fragmentos amplificados (em pares de bases - pb) pelos oligonucleotídeos senso (*forward –F*) e antisenso (*reverse – R*).

Gene	Fragmento	Seqüência 5' - 3'	
SFRS11	F	142	CAC CGA GGT AAT CCA GGT GAC TA
	R		GAC TCG GGA GGA GAC TGG TAA AG
BIRC6	F	111	CCG CCT GCA TAT GTC GCT
	R		TGC TCC AAT TAT CAT CGC CA
SOCS1	F	110	CCT GGT TGT CGT AGC AGC TTA
	R		CCT GGT TTG TGC AAA GAT ACT G
CCL28	F	130	GCT GAC GGG GAT TGT GAC TT
	R		TGC CTT TAG CCT CTT TCT TGG
COL1A2	F	148	GAG GGC AAC AGC AGA TTC ACT T
	R		CGC CAC CGA TGT CCA AAG
OPCML	F	109	GCC AGG GCT TTG TGA GTG AG
	R		ACG TCA GGG GCA GCA ACA T
TAF1B	F	124	TTT CCC CAT CAT CAA AGC ATC
	R		TAG CGT CCG TGG TAC ACT CAT
SURVIVINA	F	109	GAG AAC GAG CCC GAT TTG G
	R		CAC AAC CGG ATG AAT GCT TTT
GAPDH	F	119	GGC GTG AAC CAC GAG AAG TA TAA
	R		CCC TCC ACG ATG CCA AAG T

Amplificação dos genes selecionados por PCR em Tempo Real (RT-PCR)

Foi utilizado o método de quantificação relativa da expressão tendo o gene GAPDH como referência endógena. A expressão relativa está baseada na taxa de transcrição de um gene alvo versus um gene de referência. Todos os oligonucleotídeos foram diluídos a 100 μ M (solução estoque) e a 2 μ M (solução uso) com água ultrapura. Os *primers* foram testados em relação à contaminação e condições ideais de temperaturas de anelamento em reações de PCR convencional, utilizando cDNA de placenta bovina, já disponível no laboratório. Para todos os pares de *primers* foram testadas diferentes temperaturas de

anelamento em termociclador com gradiente de temperatura, sendo estabelecido 60°C como ideal para todos os oligonucleotídeos. Foram também testadas diferentes concentrações de *primer*, entre 50 nM e 400 nM, com a concentração de 200 nM definida como a ideal para todos os *primers*. As condições de amplificação em PCR convencional foram os seguintes: 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos para desnaturação, 58°C ou 60°C por 30 segundos para anelamento, 72°C por 45 segundos para extensão e 72°C por 5 minutos de extensão final. Para cada reação havia controles negativos livres de amostra (brancos). As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo (0.5 µg/mL de gel).

A avaliação da regulação dos genes selecionados foi realizada em sistema de detecção da *Applied Biosystems*, no equipamento *7500 Real Time PCR System*, com tecnologia *SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*), cuja molécula fluorescente emite sinal ao intercalar com DNA dupla fita, com utilização do programa *7500 System Software*, versão 1.2.3. O corante ROX foi usado como referência passiva do equipamento. As reações foram realizadas em volume final de 12 µL. Em todas as reações foi adicionado metade do volume final da reação de *SYBR Green Master Mix*, cDNA equivalente a 1,66 embrião por reação, os *primers* senso e antisenso em concentrações finais de 200 nM cada e água ultrapura para completar o volume. As condições de amplificação foram um ciclo inicial a 50°C por 2 minutos para desnaturação e ativação da UNG (*Uracil N-glycosylase*), enzima utilizada para digerir amplicons contendo uracila previamente amplificados no termociclador, seguido por 95°C por 10 minutos para ativação da AmpliTaq Gold presente no *Master Mix*, 50 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação das fitas duplas) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão). Os valores de emissão de fluorescência foram determinados ao término de cada ciclo.

Neste método de detecção, a confirmação de especificidade de amplificação é realizada por meio da análise da curva de dissociação (*melting curve*). Nesta curva, a fluorescência das amostras é analisada em relação ao aumento contínuo da temperatura, entre 60°C e 95°C, possibilitando determinar a temperatura de fusão ou de *melting* (T_m) de cada fragmento amplificado, o que permite a diferenciação entre os produtos resultantes. A curva de dissociação foi realizada após o último ciclo de amplificação a 95°C por 15 segundos, a 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. Para cada reação havia controles negativos livres de amostra (brancos). Durante a reação, a fluorescência aumenta a cada novo ciclo e atinge um limiar (*threshold*), no qual as amostras podem ser comparadas. Este ponto deve estar na faixa em que a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras é maior que a fluorescência basal, na fase exponencial da reação. O ciclo no qual o limiar de fluorescência é atingido é chamado de CT (*threshold cycle*). Assim,

amostras com maior concentração atingem o *threshold* mais precocemente, mostrando CT mais baixos. Quando a eficiência da reação está próxima de 100%, o número de cópias amplificadas aumenta de forma exponencial, dobrando a cada ciclo da reação de PCR.

Correção de Eficiência e Análise Estatística

Ao término das reações, com base nos valores detectados de fluorescência de cada ciclo das amostras analisadas para cada gene, determinou-se a eficiência média da reação de cada amostra com a aplicação do programa LinRegPCR – *Analysis of Real Time PCR Data*, versão 7.5 (RAMARKERS et al., 2003), no qual o cálculo da eficiência é baseado na curva de amplificação individual de cada tubo. Foram estabelecidos os limites inferior e superior (janela de linearidade) em que as amostras estavam em fase logarítmica, com no mínimo 4 pontos incluídos na regressão e alta correlação. O limiar de fluorescência (*threshold*) foi fixado na média dos valores extremos de fluorescência calculados pelo programa LinRegPCR.

Com base no limiar de fluorescência foram determinados os CTs para cada amostra no programa *7500 Real Time PCR System*. A quantificação final da regulação relativa dos genes de interesse foi realizada utilizando-se a comparação dos CTs de acordo com a eficiência média de cada reação (SCHEFE et al., 2006). Os cálculos foram baseados na diferença dos CTs do gene alvo normalizados pelos transcritos do gene controle endógeno GAPDH e calibrados com um indivíduo, de acordo com a seguinte fórmula:

$$rER = \frac{(E \text{ média endógeno})^{CT \text{ endógeno amostra } x}}{(E \text{ média gene})^{CT \text{ gene amostra } x}} \times \frac{(E \text{ média endógeno})^{CT \text{ endógeno amostra base}}}{(E \text{ média gene})^{CT \text{ gene amostra base}}}$$

Onde: rER = razão de expressão relativa

E = eficiência da reação

CT = ciclo em que cada curva de amplificação passa pelo *threshold*, sendo base para comparação entre amostras.

As diferenças de modulação relativa dos genes de interesse entre os grupos R8 e L8 foram estimadas tendo o GAPDH como controle endógeno. Os resultados foram comparados pela diferença entre a regulação dos genes para o grupo L8 em relação ao grupo R8 (grupo controle). Os dados normalizados foram submetidos a uma transformação logarítmica testados quanto à distribuição normal e homogeneidade das variâncias e

comparados um a um para cada gene pelo teste t-student, com exclusão dos valores além de 2 desvios-padrão, pelo programa *Statistical Analysis System*, versão 8.3 (SAS, 2005), considerando-se o nível de significância 5% ($p < 0,05$). O método de amplificação do aRNA foi avaliado pela comparação dos CTs para alguns genes entre a primeira e a segunda etapa de amplificação, nos grupos de embriões R8 e L8. A terceira etapa de amplificação não pôde ser avaliada pois não havia disponibilidade deste aRNA, que foi totalmente utilizado no experimento de hibridação.

5.4 Construção de mapas de regulação gênica (*pathways*)

Os dados do padrão de modulação gênica obtidos pelas hibridações nos arranjos foram submetidos à construção de redes de regulações gênicas utilizando o programa MetaCore (GeneGo). Este programa é baseado em um banco de dados de alta qualidade com dados sobre proteínas, interação destas com DNA, fatores de transcrição, vias de sinalização e vias metabólicas, que foi construído pelos membros da empresa GeneGo baseados na literatura e em experimentos próprios. Foram utilizadas as palavras-chave *apoptosis* e *programmed cell death* para a busca de vias de sinalização de interesse que envolvessem a função biológica desejada e os genes diferencialmente modulados previamente identificados. A figura 15 apresenta o esquema experimental utilizado, desde a produção dos embriões até os resultados finais.

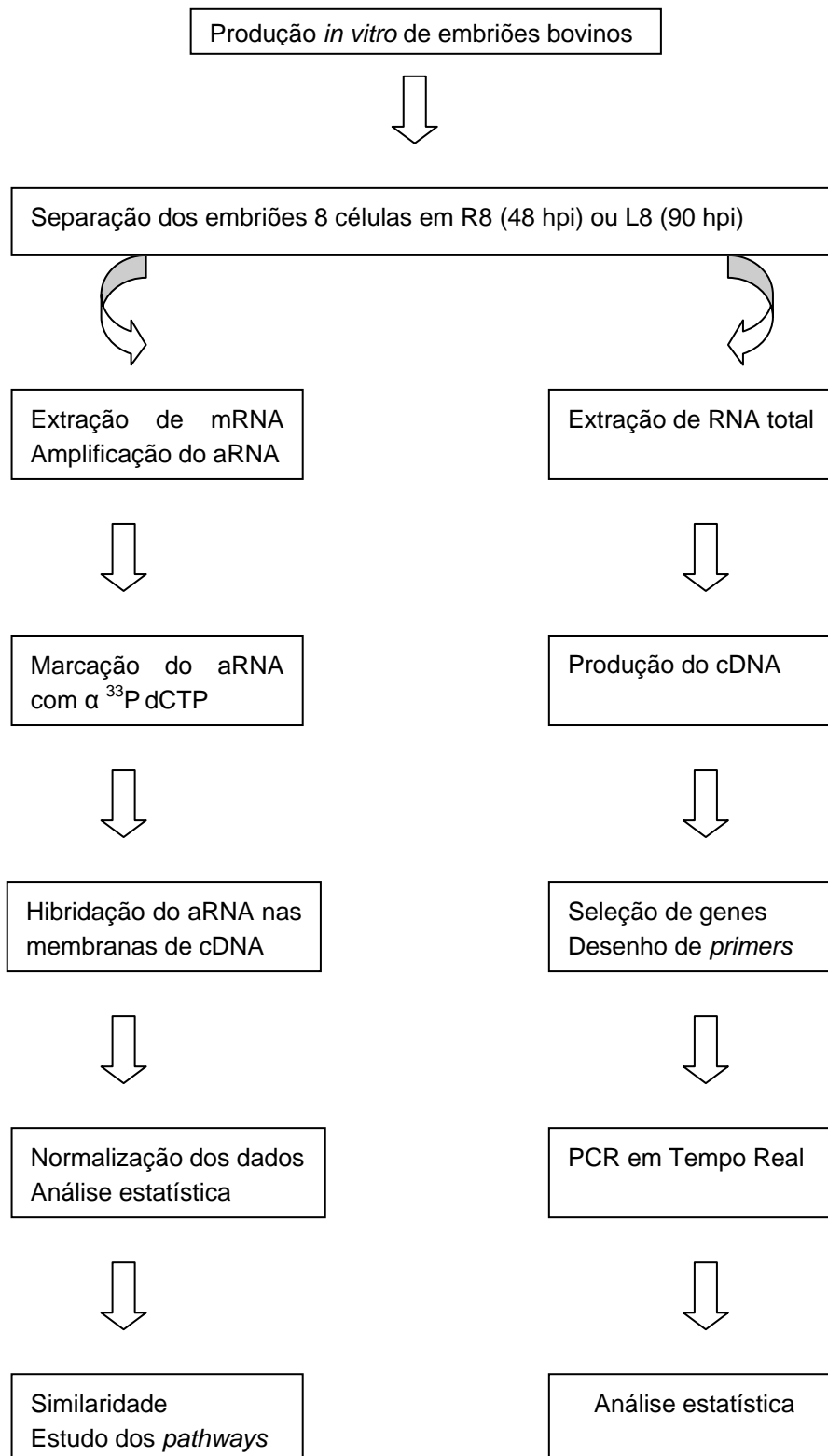


Figura 15. Esquema experimental: os embriões foram produzidos e separados nos grupos R8 e L8, sendo destinados à extração de RNA mensageiro seguida de amplificação do RNA e hibridação em membranas de arranjo ou destinados à extração de RNA total seguida de amplificação dos fragmentos de interesse por PCR em Tempo Real.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos

Em experimentos anteriores do grupo de trabalho, Watanabe e colaboradores (2002) desenvolveram um sistema de separação de embriões de acordo com sua velocidade de clivagem. Os embriões de desenvolvimento rápido seriam aqueles que atingiriam o estágio de 8 células às 48 hpi, com alta taxa de desenvolvimento até blastocisto (58%) e os embriões lentos seriam aqueles que atingiriam este estágio apenas às 90 hpi, com 34% de taxa de blastocisto e maior taxa de bloqueio. Neste estudo foi utilizado este método de separação de embriões de acordo com a cinética da clivagem. Ao todo, foram produzidos 526 embriões do grupo lento (41,7% do total) e 735 embriões do grupo rápido (58,3% do total). Foram utilizados nos experimentos de arranjo e PCR em Tempo Real 505 embriões do grupo lento e 425 embriões do grupo rápido.

6.2 Extração do mRNA e amplificação do aRNA

Quantidades limitadas de amostra requerem métodos de amplificação para obtenção de RNA suficiente para experimentos de hibridação. De forma geral, duas estratégias têm sido utilizadas para obter a quantidade suficiente de RNA para hibridação em membrana de cDNA. Os métodos baseados em PCR, embora eficientes para gerar cDNAs amplificados em abundância, têm a propensão de distorcer os dados de expressão devido à amplificação preferencial de transcritos específicos. A outra estratégia envolve a amplificação linear do aRNA pela transcrição *in vitro* com RNA polimerase T7, que permite uma maior retenção das frequências relativas dos transcritos. Este método linear proporciona uma maior variedade de tamanhos distintos de transcritos e média maior dos tamanhos dos fragmentos, mas ambos os métodos introduzem alguns desvios quando comparados ao RNA não amplificado (GINSBERG, 2005; JENSON et al., 2003; WADENBÄCK et al., 2005; WANG E et al., 2000). Robert e colaboradores (2002) mostraram que há manutenção do perfil de regulação gênica com a amplificação linear do RNA, contudo, a taxa de amplificação para cada gene depende da representatividade do transcrito deste gene na

amostra. Ou seja, aqueles transcritos mais presentes ficam mais evidenciados, dificultando a detecção dos genes menos expressos após a amplificação do RNA.

Foram realizadas um total de seis extrações de mRNA, a saber, três extrações de diferentes pools contendo 50 embriões cada dos grupos R8 e L8, seguidas de amplificação do aRNA, com uso do *MessageAmp aRNA Kit* (Ambion), que é baseado no protocolo de amplificação linear descrito por Van Gelder e colaboradores, em 1990. A amplificação do aRNA é obtida com a utilização do iniciador Oligo (dT) com promotor para enzima T7 para a síntese do cDNA e uso da enzima RNA polimerase T7 na transcrição *in vitro*.

A quantidade média de mRNA em cada embrião 8 células em camundongo é aproximadamente 0,44 pg (PIKÓ; CLEGG, 1982); portanto, em um grupo de 50 embriões para cada extração, estima-se a presença de 22pg de mRNA. Após a amplificação em duas etapas, a taxa de amplificação média foi de cerca de 400 mil vezes. Estudos na última década que analisaram a taxa de multiplicação do aRNA mostraram resultados extremamente variáveis, dependendo da concentração inicial das amostras e do uso de protocolos modificados. Na descrição do método, foi obtido apenas 3 a 5 vezes de multiplicação em uma única etapa, mas com modificações, esta taxa passou para 15 vezes a até 2.500 vezes em uma única etapa (BAUGH et al., 2001; DONNISON; PFEFFER, 2004; EBERWINE, 1996; GINSBERG et al., 2005; GOMES et al., 2003; JENSON et al., 2003; MOLL; DUSCHL; RICHTER, 2004; PHILLIPPS; EBERWINE, 1996; SCHNEIDER et al., 2004; VAN GELDER et al., 1990; WANG E. et al., 2000; WANG, 2005; ZHU; XU; BABA, 2006). Utilizando o *MessageAmp Kit* (Ambion), Chen e colaboradores (2005) e Kato e colaboradores (2007) obtiveram uma taxa de 1.000 vezes de multiplicação em uma única etapa. Após a segunda etapa de amplificação, autores relataram taxas também com grande variação na multiplicação geral, sendo relatado valores de 190 vezes a 120.000 vezes, com grande parte dos dados entre 2.500 e 7.000 vezes de amplificação geral, havendo grande fidelidade de uso de aRNA em experimentos de hibridação (BAUGH et al., 2001; GOMES et al., 2003; JENSON et al., 2003; LI et al., 2004; PARK et al., 2004; PATEL et al., 2005; STOYANOVA et al., 2004; WANG E. et al., 2000; WANG, 2005; ZHU; XU; BABA, 2006). Em um laboratório de produção de embriões *in vitro* de rotina, considerando a disponibilidade de 1.000 oócitos por semana, seriam produzidos cerca de 400 embriões do grupo R8 e 200 embriões do grupo L8. Avaliando a quantidade de RNA obtida após as duas etapas de amplificação, é possível observar que seriam necessários aproximadamente 800 anos de produção *in vitro* de embriões para obtenção de tal quantidade equivalente, caso não fosse utilizada a metodologia de amplificação do aRNA. Assim, esta metodologia permite obter RNA suficiente para experimentos de hibridação a partir de quantidades limitadas de amostras biológicas (GINSBERG, 2005; JENSON et al., 2003; STOYANOVA et al., 2004),

todavia predispõe a introdução de desvios em relação ao padrão inicial de transcrição (WADENBÄCK et al., 2005).

Apesar da grande quantidade de aRNA, a terceira etapa de amplificação do aRNA mostrou-se necessária para a obtenção de concentração suficiente de RNA, especialmente para o grupo de embriões lento, a fim de realização da hibridação em macro arranjos. Assim, para não introduzir diferenças entre os grupos, foi feita a terceira etapa de amplificação do aRNA para ambos os grupos. Entretanto, para que fossem normalizadas as concentrações de RNA iniciais no arranjo, foram separados 15 µg de aRNA de cada grupo embrionário (R8 e L8) para confecção da sonda. Esta concentração foi equivalente a 50 embriões do grupo R8 e 130 embriões do grupo L8.

6.3 Hibridação das membranas (*macroarrays*)

As técnicas de macro e micro arranjo de DNA constituem poderosas ferramentas para monitorar simultaneamente o perfil de expressão de muitos genes, permitindo a análise em larga escala dos fenômenos biológicos que ocorrem em células, tecidos ou organismos. Estas técnicas têm sido empregadas em muitos estudos na embriologia (ADJAYE et al., 2007; ARONOW; RICHARDSON; HANDWERGER, 2001; CHEN et al., 2005; DALBIÈS-TRAN; MERMILLOD, 2003; ELLESTAD et al., 2006; FAIR et al., 2007; JEONG et al., 2006; JONES et al., 2008; KATO et al., 2007; LI; CUI; KIM, 2006; MAMO et al., 2006a, 2006b; SIRARD et al., 2005) proporcionando a descoberta de inúmeros genes importantes em cada etapa, para cada organismo.

Neste estudo, para cada grupo experimental (R8 e L8) foram utilizadas três membranas apresentando 936 pontos em duplicata, sendo 156 controles de qualidade de espotagem e hibridação distribuídos na membrana e 780 clones provenientes da biblioteca humana de cDNAs oriunda de vários tecidos, obtida do Consórcio IMAGE. As membranas foram denominadas SH (Seleção Humana) e numeradas.

Todas as membranas, por apresentarem genes representados em duplicata, foram analisadas como duas repetições cada uma. Apenas uma membrana do grupo de embriões R8 não pôde ser avaliada pela grande quantidade de *background* e foi desconsiderada da análise nas etapas seguintes. Assim, o grupo L8 apresentou seis repetições (oriundas de três membranas) e o grupo R8 apenas quatro repetições (oriundas apenas de duas membranas pela impossibilidade de análise da terceira membrana). Mesmo nas membranas

que participaram da análise, algumas porções e pontos de cada membrana foram excluídos em análise visual no *Array Gauge* v1.1 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) devido ao *background* intenso.

Após a captação das imagens e quantificação dos sinais obtidos nos pontos, foi feita a subtração do valor de *background* não específico, presente em toda a membrana, de acordo com as instruções do fabricante do programa. Esta subtração busca remover o nível de ruído, permitindo fazer uma comparação entre os sinais específicos de cada ponto (CAUSTON; QUACKENBUSH; BRAZMA, 2003).

6.4 Análise dos resultados da hibridação

Filtragem e normalização nas membranas

Tendo em vista que a frequência de transcritos é rotineiramente considerada sinônimo de expressão gênica, neste trabalho foram adotadas as terminologias modulação ou regulação gênica. Os passos necessários para uma análise eficiente dos dados de arranjos gerados após a obtenção das imagens processadas são a filtragem e normalização dos dados, além da identificação do padrão de expressão. A filtragem é importante para restringir o volume de dados; por exemplo, leva-se em consideração apenas o gene modulado acima de um determinado valor estipulado pelo experimentador e são desconsiderados aqueles que não apresentarem variação do nível de expressão entre os tratamentos. A normalização é necessária para permitir a comparação direta do padrão de expressão e deve ser efetuada tanto entre amostras no mesmo arranjo, quanto para o conjunto dos experimentos (CAUSTON; QUACKENBUSH; BRAZMA, 2003; HARRINGTON; ROSENOW; RETIEF, 2000)

Os valores de marcação quantificados pelo *Array Gauge* v1.1 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan), subtraído o ruído de fundo (*background*), foram transportados para o *Microsoft Excel 2000* (Microsoft, USA). Neste programa foi feita a filtragem dos dados com o cálculo de mediana horizontal, por gene, e a divisão dos valores brutos por esta mediana horizontal. A escolha da mediana deve-se ao fato de que, por esta ser o valor central do sinal dos pontos, ela é menos sensível à presença de valores extremos do que, por exemplo, a média. Sob estes valores foi feita a seleção dos *outliers* nos valores brutos, na qual foram excluídos aqueles valores que estavam 3 desvios-padrões acima ou abaixo da mediana. Foram calculadas medianas em coluna e os valores brutos foram divididos por esta

mediana vertical, para normalização entre as replicatas, sob os quais foram calculados as medianas, as médias, valores máximos, mínimos, primeiro e terceiro quartis e desvio padrão para cada repetição, de cada grupo de embriões (Anexo A). Devido à filtragem pelas quais os dados foram submetidos, com a exclusão dos valores *outliers*, e à boa normalização dos dados, foi possível observar que todas as medianas apresentaram valor 1. Estes padrões foram utilizados para configuração de gráficos diagnósticos no Excel, para cada grupo experimental (Figuras 16, 17, 18 e 19). Nas figuras abaixo, naquelas de número par (16 e 18) estão representadas todas as informações obtidas na análise, e naqueles de número ímpar (17 e 19), foram excluídos os valores máximos dos gráficos para facilitar a visualização do restante dos dados.

Pela análise das figuras, é possível observar que o grupo R8, devido à retirada da membrana com alto índice de *background*, mostrou um resultado mais linear para todos os parâmetros, em relação ao grupo L8. Entretanto, as etapas de filtragem dos *outliers* e normalização foram consideradas adequadas para ambos os grupos, sendo os dados normalizados então exportados para o programa *TIGR MeV: MultiExperiment Viewer*, versão 4.0 (TIGR) para a comparação da modulação entre os grupos.

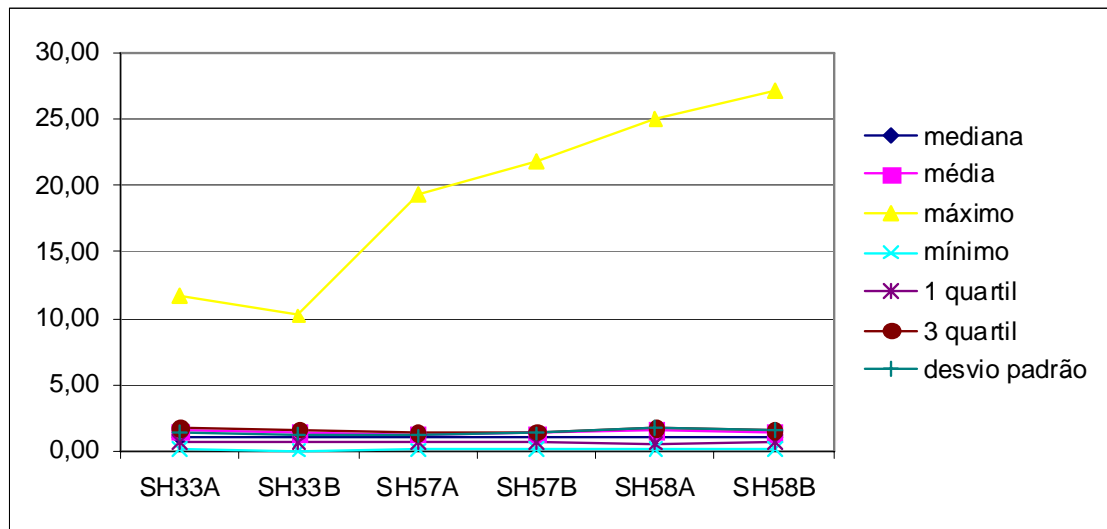


Figura 16. Diagnóstico dos resultados após filtragem e normalização em embriões do grupo L8, em todas as replicatas.

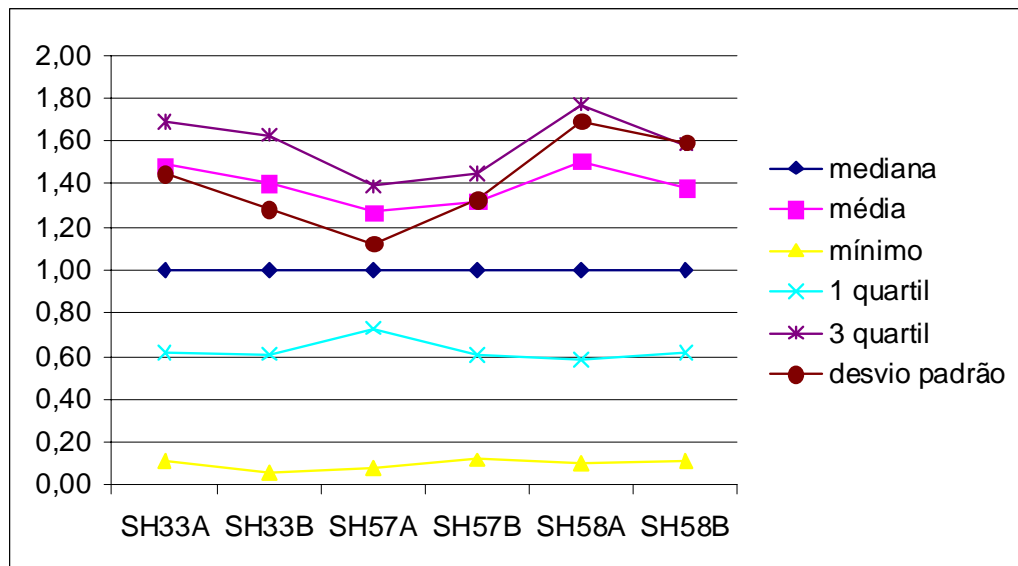


Figura 17. Diagnóstico dos resultados após filtragem e normalização em embriões do grupo L8, excluídos os valores máximos, em todas as replicatas.

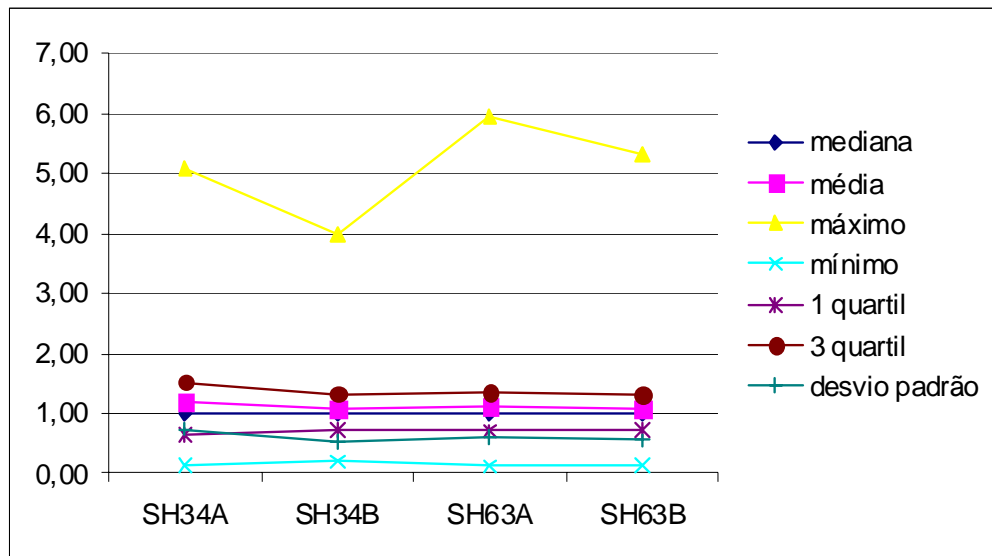


Figura 18. Diagnóstico dos resultados após filtragem e normalização em embriões do grupo R8, em todas as replicatas.

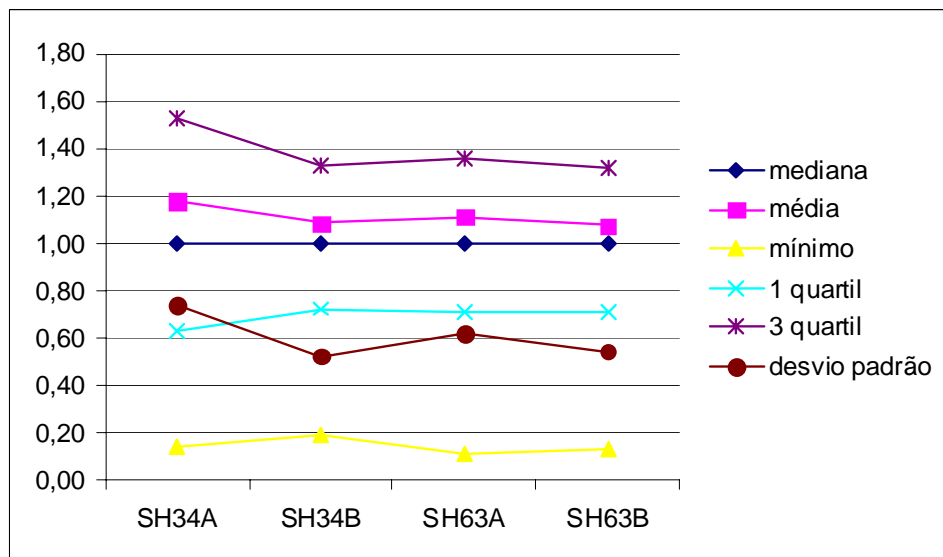


Figura 19. Diagnóstico dos resultados após filtragem e normalização em embriões do grupo R8, excluídos os valores máximos, em todas as replicatas.

Análise estatística e de clusterização nas membranas

A análise dos dados e a identificação do padrão com significado biológico são as etapas mais complexas devido ao volume de informações geradas. A interpretação dos dados varia desde uma lista de genes que são induzidos e regulados negativamente em função do tratamento, até análises de agrupamentos sofisticados, como por exemplo, o agrupamento hierárquico (HARRINGTON; ROSENOW; RETIEF, 2000).

Para a determinação dos genes com mudanças significativas na regulação gênica, utilizou-se um gráfico de dispersão da diferença relativa observada *versus* a diferença relativa esperada. O limiar Δ foi escolhido com base no nível de significância estimada pelo $FDR \leq 0,05$ e no número de genes (Figura 20). Os pontos em verde representam genes regulados negativamente e os pontos em vermelho aqueles regulados positivamente no grupo L8, em relação ao grupo R8.

Os pontos demonstrados no gráfico de dispersão foram quantificados na ferramenta SAM do programa *TIGR MeV: MultiExperiment Viewer*, versão 4.0 (TIGR) de acordo com os níveis de regulação (*fold change*) e o *q-value*. Assim, é possível observar e quantificar os genes regulados negativamente ou positivamente. Na tabela 3, estão relatados os 20 genes cuja modulação é inferior no grupo L8 em relação ao R8, de acordo com o gráfico de dispersão. Na tabela 4, por sua vez, estão demonstrados os 100 genes com modulação superior nos embriões L8 em relação ao grupo R8. As funções moleculares aqui relatadas foram obtidas do banco de dados SOURCE (2000). É possível observar que os genes normalmente têm mais de uma função biológica, de acordo com este banco de dados.

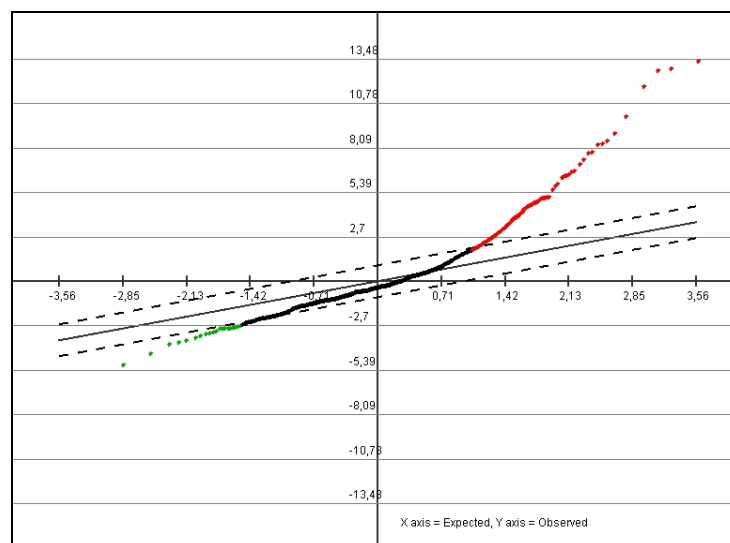


Figura 20. Gráfico de dispersão da diferença relativa observada $D(i)$ e esperada $D(e)$. As linhas tracejadas são cortes a uma distância Δ da linha contínua.

Tabela 3. Genes com modulação negativa no grupo L8 em relação ao grupo R8.

CLONE ID	SÍMBOLO GENE	FOLD CHANGE	Q-VALUE	FUNÇÃO/PROCESSO BIOLÓGICO
23959	MAPK8IP2	0.7178	0.0382	Proteína "scaffold" de MAP-quinase; ligação a proteína quinase
36844	IL1RN	0.7047	0.0488	Antagonista do receptor de Interleucina-1, ligação a proteína
143443	TBXAS1	0.7044	0.0488	Atividade isomerase
23685	C17orf75	0.6930	0.0072	Possível papel na espermatogênese
134542	AKAP13	0.6915	0.0468	Cascata da proteína quinase
144675	TLR3	0.6832	0.0488	Receptor transmembrana; ligação a RNA dupla fita
39274	LIG4	0.6494	0.0488	Ligação a ATP, DNA e proteína
40010	COG7	0.6419	0.0488	Ligação a proteína, transporte de proteínas
142427	NOL7	0.6353	0.0467	Proteína nucleolar sem função descrita
132742	PTGIR	0.6032	0.0000	Receptor celular
24392	BAT3	0.6009	0.0197	Ligação a proteína
41004	MYT1L	0.5926	0.0488	Fator de transcrição
34010	UQCRC2	0.5853	0.0363	Respiração aeróbica
41333	MAP3K2	0.5834	0.0072	Proteína quinase
137457	RBM35B	0.5432	0.0360	Ligação a RNA
41391	CYP4X1	0.5098	0.0488	Atividade monooxigenase
24683	UBC	0.5066	0.0073	Ubiquitina
136117	BIVM	0.4803	0.0378	Sem função descrita
141226	PSMA5	0.3690	0.0480	Atividade treonina endopeptidase
24781	POLE3	0.2668	0.0000	Atividade polimerase

Tabela 4. Genes com modulação positiva no grupo L8 em relação ao grupo R8.

CLONE ID	SÍMBOLO GENE	FOLD CHANGE	Q-VALUE	FUNÇÃO/PROCESSO BIOLÓGICO
131791	SFRS11	281.8225	0.0484	Ligação e processamento do pré-mRNA
134265	BIRC6	69.0459	0.0000	Inibidor de caspase, anti-apoptótico
640253	Socs1	31.2660	0.0000	Transdução de sinal, regulação negativa do receptor de insulina
136919	CCL28	29.5075	0.0000	Atividade quemoquina, resposta imune
133257	COL1A2	19.8410	0.0000	Adesão celular, ligação a proteína
23878	OPCML	19.3947	0.0000	Adesão celular, receptor de opióide
26623	FAT4	16.1757	0.0000	Adesão celular, ligação ao cálcio
21642	ABCA2	12.4142	0.0000	Ligação a ATP, atividade ATPase
137150	CAMTA1	11.6965	0.0000	Ativa transcrição, candidato a gene supressor de tumor
5266573	ERCC4	11.5808	0.0000	Ligação a DNA, sistema de reparo
22306	CDC14A	11.2467	0.0000	Citocinese
136744	SPOP	10.7844	0.0000	Processamento de mRNA
136775	OSGEPL1	10.7567	0.0000	Atividade endopeptidase
26966	CYP26B1	10.3542	0.0000	Atividade monooxigenase, transporte de elétrons
130414	Lócus transcrito	10.3343	0.0000	Sem função descrita
130541	PECAM1	9.7552	0.0000	Ligação a proteína, transdução de sinal
135346	WNT10A	9.5170	0.0000	Transdução de sinal da via WNT
137836	PDCD10	9.4516	0.0000	Pró-apoptótico
140379	ATP8A1	8.9052	0.0000	Ligação a ATP
22134	ARHGAP26	8.5882	0.0000	Regulador positivo de Rho GTPase
137275	INPP5E	8.4768	0.0000	Atividade hidrolase
135131	SET	8.4486	0.0000	Replicação do DNA, ligação a histona
34449	CDC2L6	8.3455	0.0000	Citocinese
130071	Em múltiplos clusters	8.0179	0.0000	Sem função descrita
137971	NKIRAS2	8.0019	0.0000	Sinalização da cascata NF-kappaB, atividade GTPase
135016	INSL4	7.9319	0.0000	Proliferação celular, ligação ao receptor do fator semelhante a insulina
140775	LOC125893	7.8792	0.0000	Ligação a ácidos nucleicos

Continua

Tabela 4. Genes com modulação positiva no grupo L8 em relação ao grupo R8. Continuação

CLONE ID	SÍMBOLO GENE	FOLD CHANGE	Q-VALUE	FUNÇÃO/PROCESSO BIOLÓGICO
135802	ADAM12	7.8489	0.0000	Atividade metaloendopeptidase, adesão celular
4971952	Pdia4	7.7800	0.0000	Transporte de elétrons, ligação ao cálcio
138907	OLR1	7.3049	0.0000	Atividade receptor, transdução de sinal
135240	ATF7IP CDNA FLJ43113 fis	6.3451	0.0000	Ligação a proteína, metilação do DNA
135338	TAF1B	6.1869	0.0000	Fator de transcrição
25625	GPR44	6.1830	0.0000	Atividade receptor, transdução de sinal
136218	TIA1	5.9972	0.0000	Pró-apoptótico
131597	HIVEP2	5.9400	0.0000	Regulação da transcrição, ligação a DNA
136872	POU2F3	5.7695	0.0000	Fator de transcrição, desenvolvimento da epiderme
24958	AMOTL1	5.5619	0.0087	Ligação a proteína, junção celular
41793	PRKRA	5.2963	0.0000	Anti-apoptótico, ligação a RNA
135241	PSMC1	4.7991	0.0000	Atividade hidrolase, ligação a nucleotídeo e ATP
137094	RASA1	4.6085	0.0000	Regulador positivo de GTPase
138412	EGFL6	4.5945	0.0000	Anti-apoptótico, membro família EGF
135972	TAF4	4.4560	0.0000	Fator de transcrição
42485	TADA3L	4.4028	0.0000	Fator de transcrição, regulador do ciclo celular
137630	TBCC	4.2020	0.0000	Formação de beta-tubulina, ligação a chaperona
40562	SGCB	4.1672	0.0000	Organização do citoesqueleto
135454	STRA6	3.9501	0.0000	Formador de colágeno
576610	Ccl21a	3.8209	0.0000	Atividade quemoquina, resposta imune
26460	MMD2	3.8202	0.0000	Citólise, atividade receptor
137794	ACVR2B	3.7869	0.0000	Atividade serina/treonina quinase, atividade receptor
39254	POLR1E	3.7727	0.0000	Atividade transferase, ligação a DNA
23599	PCDH11X	3.7362	0.0000	Adesão celular, ligação ao cálcio
133136	DEK	3.7054	0.0000	Fator de transcrição
23607	APC	3.6406	0.0000	Via de sinalização WNT
139522	CDNA FLJ39389 fis	3.6144	0.0000	Sem função descrita
134333	Locus transcrito	3.2315	0.0000	Atividade endonuclease

Continua

Tabela 4. Genes com modulação positiva no grupo L8 em relação ao grupo R8. Continuação

CLONE ID	SÍMBOLO GENE	FOLD CHANGE	Q-VALUE	FUNÇÃO/PROCESSO BIOLÓGICO
32322	CCNG1	3.1226	0.0000	Mitose
2383277	XRCC4	3.0775	0.0000	Reparo do DNA
135226	VDP	3.0410	0.0078	Transporte de proteínas intracelulares
41541	SF3B3	3.0185	0.0000	Processamento do pré-mRNA
27476	TRAIP	2.9698	0.0000	Pró-apoptótico
576848	Stat3	2.9598	0.0000	Fator de transcrição
31366	MYT1	2.8675	0.0000	Fator de transcrição
135085	AP3S2	2.8052	0.0000	Transporte de proteínas intracelulares
131268	GRB14	2.6793	0.0137	Sinalização intracelular
136399	CREB3L2	2.6752	0.0081	Fator de transcrição
135713	CYP19A1	2.6506	0.0367	Atividade aromatase
32970	MRPS6	2.5802	0.0000	Biossíntese de proteínas
139127	ATF5	2.5232	0.0000	Fator de transcrição
136188	MSX1	2.4866	0.0074	Fator de transcrição
130111	TOPBP1	2.4520	0.0000	Replicação do DNA
133672	CCBP2	2.3824	0.0416	Receptor de quemoquinas
23675	RAB14	2.3690	0.0000	Transdução de sinal mediado por GTPase
575202	Stat4	2.3555	0.0139	Fator de transcrição, ligação a DNA
139579	Lócus transcrito	2.3506	0.0000	Sem função descrita
	Dado não encontrado	2.2979	0.0076	Sem função descrita
53110	Lócus transcrito	2.2458	0.0000	Atividade serina/treonina quinase
133432	RPS6KB1	2.2365	0.0000	Atividade serina/treonina quinase
132690	PDCD4	2.2140	0.0000	Pró-apoptótico, supressor de tumor
574888	Prmt2	2.0509	0.0260	Atividade metiltransferase, processamento do RNA
132217	PAK3	2.0218	0.0081	Atividade serina/treonina quinase
26021	DLG4	1.9233	0.0076	Atividade guanilato quinase
135083	PDIA3	1.9230	0.0079	Atividade endopeptidase, transporte de elétrons

Continua

Tabela 4. Genes com modulação positiva no grupo L8 em relação ao grupo R8. Continuação

CLONE ID	SÍMBOLO GENE	FOLD CHANGE	Q-VALUE	FUNÇÃO/PROCESSO BIOLÓGICO
135692	PLA2G5	1.8987	0.0083	Atividade hidrolase
139571	CCNI	1.8583	0.0000	Mitose
136579	SYK	1.8451	0.0382	Atividade transferase, ligação a proteína
139662	CDA08	1.7856	0.0079	Modulação do sistema imune
26289	EHMT1	1.7829	0.0074	Metiltransferase
136441	EFNB1	1.7800	0.0201	Ligação a receptor
574949	Ide	1.7403	0.0467	Atividade hidrolase
576775	Tap1	1.7345	0.0367	Atividade ATPase
29900	TFAM	1.7197	0.0139	Fator de transcrição
140315	IFI27	1.7185	0.0083	Resposta imune
133672	CCBP2	1.6534	0.0203	Receptor de quemoquina
3586130	Itga4	1.6032	0.0367	Adesão celular
138369	FCGR2B	1.5674	0.0083	Resposta imune, atividade receptor
37986	ECEL1	1.5492	0.0472	Atividade metalopeptidase
32510	BTG2	1.5361	0.0197	Fator de transcrição
131127	RAB7B	1.5074	0.0139	Transdução de sinal mediado por GTPase
29943	BZRAP1	1.4607	0.0488	Ligação a receptor
41650	HGF	1.3487	0.0472	Mitose, fator de crescimento

Conclusão

Os dados resultantes da análise pelo SAM foram utilizados na ferramenta *Hierarchical Clustering* (HCL) do programa *TIGR MeV: MultiExperiment Viewer*, versão 4.0 (TIGR), na qual estes mesmos genes foram agrupados de acordo com os perfis de regulação, ou seja, genes mais modulados (positivos) e menos modulados (negativos), em *clusters* próximos. Os agrupamentos obtidos possibilitam a visualização dos perfis de regulação gênica nas duas situações estudadas (desenvolvimento embrionário rápido e lento), bem como a comparação entre os mesmos. Ou seja, após a análise pelo SAM e HCL foi possível separar quais genes estão diferencialmente modulados entre os dois grupos de diferentes cinéticas de desenvolvimento. Nas figuras 21 e 22 estão representados os 20 genes de modulação inferior em L8 e os 100 genes de modulação superior em L8 em relação a R8, respectivamente.

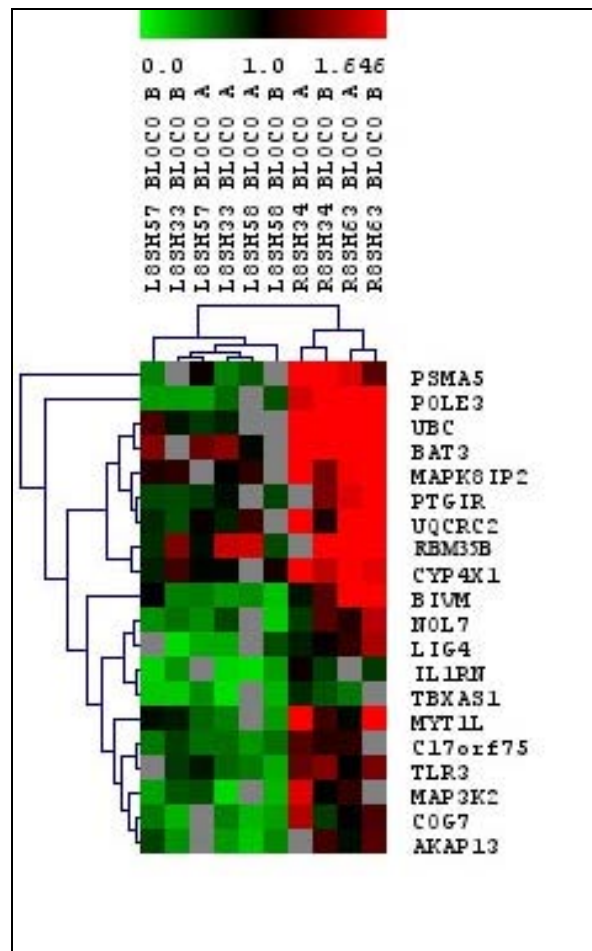


Figura 21. Agrupamento hierárquico (HCL) dos resultados obtidos nos experimentos (colunas), visualizando-se o padrão de regulação gênica (linhas) apresentados pelos embriões do grupo L8 e R8. Representação dos 20 genes com modulação inferior no grupo L8 em relação ao grupo R8. O valor da regulação normalizada para cada gene (de acordo com a escala acima) é representado pelas cores. Vermelho indica níveis de regulação maiores que a mediana e verde indica níveis de regulação menores que a mediana. Cinza indica valores excluídos durante a normalização. Preto indica valores sem modificação na modulação gênica.

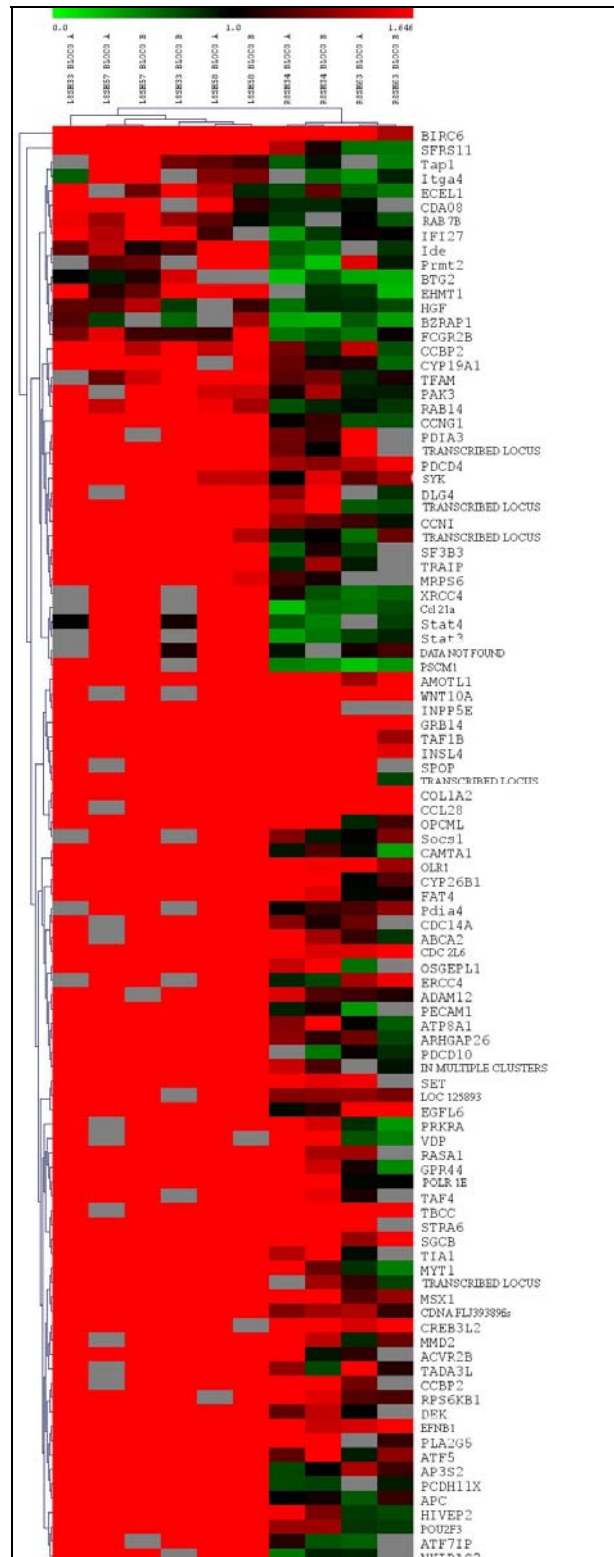


Figura 22. Agrupamento hierárquico (HCL) dos resultados obtidos em embriões do grupo L8 e R8, em cada replicata. Aqui estão representados os 100 genes com modulação significativamente superior no grupo L8 em relação ao grupo R8. Vermelho indica níveis de regulação maiores que a mediana e verde indica níveis de regulação menores que a mediana. Cinza indica valores excluídos durante a normalização. Preto indica valores sem modificação na modulação gênica.

Categorização das seqüências

A categorização dos genes significativamente modulados foi realizada pela utilização de algumas ferramentas eletrônicas que compilam informações de vários bancos de dados, como o SOURCE, TIGR e *Gene Ontology*, especialmente este último, que é dividido em três categorias que refletem aspectos biológicos: função molecular, processo biológico e componente celular. Os genes podem ser anotados em mais de um termo de uma categoria, já que um mesmo gene pode ter mais de uma função e participar de vários processos biológicos. Outra ferramenta utilizada foi o programa EASE (*Expression Analysis Systematic Explorer*, versão 2.0)

Entre os 20 genes de modulação inferior em L8 em relação a R8, 6 foram categorizados em mais de uma função molecular (duas ou três) e 5 não tiveram função determinada. A metade dos genes (50%) mostrou ter pelo menos uma função de ligação, seja a proteínas, ácidos nucléicos ou nucleotídeos. Destes genes com alguma função de ligação, 70% deles apresentaram ligação a proteínas como função única ou conjunta a outras. Quatro genes apresentaram exclusivamente função catalítica, e mais um gene mostrou função catalítica e de ligação a nucleotídeo. Apenas um gene mostrou função de fator de transcrição entre os genes regulados negativamente, o gene denominado MYT1L (*Myelin transcription factor 1-like*). Este fator de transcrição está presente no núcleo celular, e está associado à diferenciação neuronal e desenvolvimento dos neurônios (WANG et al., 2007). MYT1L e MYT1 (*Myelin transcription factor*) mediam a sinalização de repressão transcricional via ligação com desacetilases de histonas (ROMM et al., 2005).

Dois genes interessantes entre os modulados negativamente foram a MAPK8IP2 (*Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2*) e a MAP3K2 (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2*), que estão envolvidos na cascata de sinalização da JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*). Esta cascata é ativada por sinais de estresse celular, levando à MCP (BONVIN et al., 2002; YASUDA et al., 1999). As MAPKs estão envolvidas na iniciação e progressão da meiose em oócitos bovinos (FISSORE; HE; WOULD, 1996).

O gene BAT3 (*HLA-B associated transcript 3*), também modulado negativamente nos embriões L8 em relação aos embriões R8, é um gene com atividade regulatória de proliferação celular, sendo recentemente associado à regulação apoptótica em osteosarcomas com presença do papilomavírus humano (TSUKAHARA et al., 2008) e à sinalização do TGF- β (*transforming growth factor beta*) na expressão do colágeno tipo 1 (KWAK et al., 2008).

Na tabela 5 está relacionada a porcentagem de genes incluídos em cada função. O valor ultrapassa 100%, pois alguns genes foram classificados em mais de uma função. Apenas os genes MAPK8IP2 e BAT3 têm como processo biológico exclusivo a participação

em vias de sinalização de morte celular programada. Na figura 23 estão representados os dados em números absolutos para esta categorização.

Tabela 5. Categorização dos genes menos modulados em L8 em relação a R8.

Função molecular	Genes categorizados nesta função
ligação à proteína	40%
atividade catalítica	25%
Não determinada	25%
ligação a receptor	10%
Ligação a ácido nucléico	20%
ligação a nucleotídeos	15%
Fator de transcrição	5%

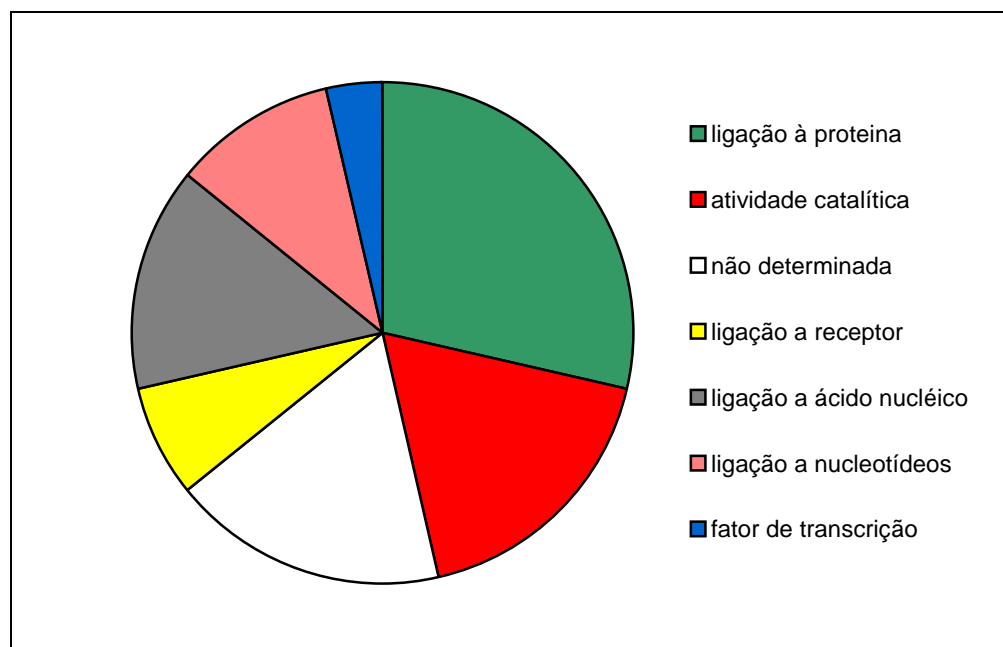


Figura 23. Distribuição das funções moleculares dos genes regulados negativamente em embriões L8 em relação a R8.

Entre os 100 genes regulados positivamente em L8 em relação a R8, 45 foram categorizados em mais de uma função molecular, e 14 não tiveram sua função determinada. Mais da metade (68%) dos genes foi classificado em pelo menos uma função de ligação, e destes, 60% foi categorizado pelo menos como ligante a proteína. Vinte e dois genes apresentaram função catalítica, sozinha ou em conjunto com outras funções e nove foram classificados como fatores de transcrição.

O gene mais significativamente modulado em L8 foi o SFRS11/SRp54 (*Splicing factor, arginine/serine-rich 11*), cuja proteína de 54 kD pertence à família *Splicing factor SR*, tem localização nuclear e está envolvida no processamento (*splicing*) do pré mRNA, tanto

na forma constitutiva quanto alternativa. No núcleo, ela está associada a componentes do processamento, incluindo pré-mRNA e mRNA já processado. O SFRS11 também regula a transcrição por ligar-se ao DNA (SAKASHITA et al., 2004; WU et al., 2006). Wu e colaboradores (2006) relataram que esta proteína está associada ao processamento de um éxon do gene tau, no cromossomo 17, associado à doença de Parkinson.

Em seguida, o gene mais modulado foi o BIRC6 (*Baculoviral IAP repeat-containing 6/apollon*), cujo produto codifica uma proteína com um domínio inibidor de MCP, que facilita a degradação de proteínas apoptóticas Smac/Diablo pela ubiquitinação, inibindo a MCP via mitocondrial, ou seja, atuando como anti-apoptótico (HAO et al., 2004; MARTIN, 2004).

Outro gene com alta modulação foi o SOCS1 (*Suppressor of cytokine signaling 1*), também chamado JAB ou SSI-1, cujo produto regula negativamente a transdução de sinal das citocinas pela cascata JAK/STAT3. Esta cascata é ativada por sinais extracelulares, que envolve receptores de superfície celular e quinases citoplasmáticas Janus (Jaks) além de transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs). O produto do gene SOCS1 liga-se às Jaks, inibindo sua atividade quinase (ENDO et al., 1997; STARR; HILTON, 1998; STARR et al., 1997). Ou seja, SOCS1 tem um papel central no controle da intensidade e/ou duração da resposta celular a diversos estímulos extracelulares pela supressão do processo de transdução de sinal (STARR et al., 1997)

O gene CCL28 (*Chemokine C-C motif ligand 28*) pertence à família das quemoquinas, que, juntamente com seus receptores, têm um papel central no tráfico, recrutamento e recirculação de linfócitos. Esta proteína, portanto, atua no sistema imunológico e em processos inflamatórios, ligando-se a receptores especialmente em tecidos epiteliais (KUNKEL; BUTCHER, 2002; WANG W. et al., 2000).

Entre os genes transcritos diferencialmente e mais modulados no grupo L8, está o COL1A2 (*Collagen, type I, alpha 2*), proteína de matriz extracelular que codifica uma das cadeias do colágeno tipo I. Mutações neste gene estão associadas a várias doenças, incluindo osteogênese imperfeita (KUIVANIEMI; TROMP; PROCKOP, 1991).

Também está presente nesta listagem o gene OPCML/OBCAM (*Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like*), cuja proteína é um membro da família das imunoglobulinas presente na membrana plasmática, funcionando também como receptor de opióide (SHARK; LEE, 1995). Esta proteína está altamente expressa no sistema nervoso, atuando no reconhecimento celular e inibição da migração de axônios. Existem relatos de que esta proteína atua como supressora de tumor em carcinoma cerebral (REED et al., 2007), além de sua inativação via sinalização do oncogene Ras (*RAS family of small GTPases*) estar associada a tumores ovarianos (MEI et al., 2006; SELLAR et al., 2003).

O fator de transcrição TAF1B ou TAFI63 (*TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, B, 63kDa*) está relacionado à transcrição da RNA polimerase I,

sendo um dos formadores do complexo SL1 (*selectivity factor 1*), composto por uma TBP (*TATA binding-protein*) e três TAFs (*TBP associated factors*) específicos para a RNA polimerase I (FRIEDRICH et al., 2005). Mutações levando à inativação de TAF1B estão associadas a carcinomas colorretais (KIM et al., 2002).

Os genes identificados em vias de sinalização apoptóticas entre estes mais modulados em embriões L8 foram o BIRC6, o fator de transcrição ATF5 (*activating transcription factor 5*), o supressor de tumor PDCD4 (*programmed cell death 4*), o regulador pós-transcricional de mRNA TIA-1 (*T-cell restricted intracellular antigen-1*) e a proteína fosfatase regulatória de ciclo celular CDC14A (*cell division cycle 14 homolog A S. cerevisiae*).

Na tabela 6 está relacionada a porcentagem de genes incluídos em cada função, dentro deste grupo com modulação positiva em L8. O valor ultrapassa 100% pois alguns genes foram classificados em mais de uma função. Na figura 24 estão representados os dados em números absolutos para esta categorização.

Tabela 6. Categorização dos genes mais modulados em L8 em relação a R8.

Função molecular	Genes categorizados nesta função
ligação à proteína	40%
atividade catalítica	22%
não determinada	14%
ligação a receptor	13%
ligação a ácido nucléico	15%
ligação a nucleotídeos	14%
fator de transcrição	9%
Transdução de sinal	4%
molécula estrutural	2%
Ligação a íons	7%
enzima regulatória	2%
Organogênese	2%
proteína transportadora	1%

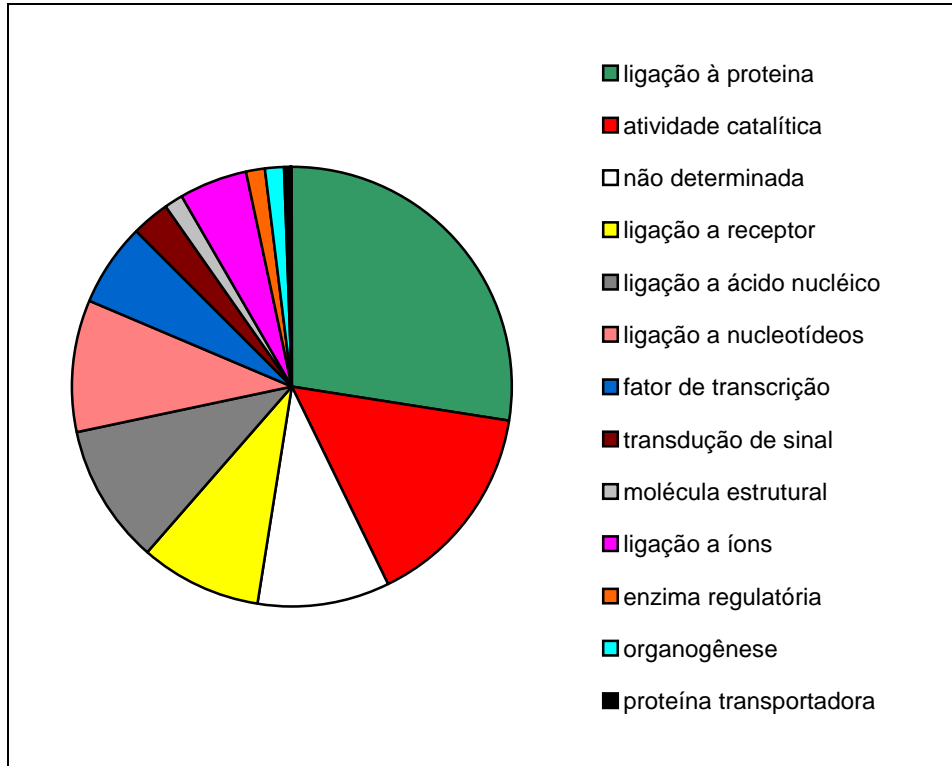


Figura 24. Distribuição das funções moleculares dos genes regulados positivamente em embriões L8 em relação a R8.

Similaridade dos genes diferencialmente modulados nas membranas

Segundo os dados de seqüências depositados até novembro de 2008, dos 20 genes modulados negativamente em embriões L8 em relação aos embriões R8, apenas um (5%) não apresentou similaridade com seqüências do genoma de *Bos taurus*. A média de similaridade entre o genoma de humanos e bovinos naqueles genes para os quais houve similaridade foi de 86,78% com variação de 81% a 94%. Os dados da tabela 7 demonstram todas as informações nos genes modulados negativamente em L8.

Para os dados de 100 genes modulados positivamente em L8, 12 (12%) não apresentaram seqüências similares no genoma de *Bos taurus*. A média de similaridade dos genes entre os genomas naqueles genes para os quais houve similaridade foi de 87,87% variando de 73% a 100%. A tabela 8 mostra os dados referentes aos genes positivamente modulados em L8.

O uso de membrana heteróloga foi descrito no trabalho de Dalbiès-Tran e Mermillod (2003), que utilizaram membrana com fragmentos de cDNA humano hibridada com RNA total de oócitos bovinos, amplificado linearmente por PCR e marcado com ³²P. Apesar das limitações inerentes ao procedimento, a correlação entre as membranas duplicatas foi de 0,993, refletindo ótima reprodutibilidade da produção da sonda e da hibridação. No presente estudo detectou-se a presença de 24% dos genes da membrana na amostra de RNA, o que esteve dentro do esperado (entre 20 e 70% de hibridação) para o tipo de membrana utilizada no experimento. Vallée e colaboradores (2006) utilizaram uma membrana contendo cDNA de três diferentes espécies com o objetivo de verificar genes evolutivamente conservados em oócitos. No Brasil, Siqueira e colaboradores (2004) utilizaram RNA total de folículos ovarianos bovinos marcados com ³³P em membrana contendo cDNA humano, com correlação entre as membranas duplicatas de 0,98 e 0,99, dependendo do grupo de amostras utilizadas.

Tabela 7. Similaridade das seqüências entre o genoma humano e bovino nos genes regulados negativamente no grupo L8.

SÍMBOLO GENE	GENBANK/UNIGENE	EVALUE	SIMILARIDADE	GEN BANK BOVINO
MAPK8IP2	NM_012324	0	86	XM_871210.2
IL1RN	NM_173842	1e-132	81	NM_174357.2
TBXAS1	NM_001061	0	85	NM_001046027.1
C17orf75	NM_022344	0	86	XR_043004.1
AKAP13	NM_006738	0	85	XM_580384.3
TLR3	NM_003265	0	83	NM_001008664.1
LIG4	NM_002312	0	85	XM_001249516.2
COG7	NM_153603	0	88	NM_001083372.1
NOL7	NM_016167	0	87	NM_001034384.1
PTGIR	NM_000960	0	85	NM_001015622.1
BAT3	NM_004639	0	90	XM_001789972.1
MYT1L	NM_015025	0	86	NM_001078012.1
UQCRC2	NM_003366	0	88	BC102337.1
MAP3K2	NM_006609	0	90	XM_580739.4
RBM35B	NM_024939	0	86	XM_588103.3
CYP4X1	NM_178033			Nenhuma seqüência similar a <i>Bos taurus</i>
UBC	NM_021009	0	91	XM_874550.3
BIVM	NM_017693	3e-38	94	XR_042587.1
PSMA5	NM_002790	0	92	BC102343.1
POLE3	NM_017443	0	81	NM_001034390.1

Tabela 8. Similaridade das seqüências entre o genoma humano e bovino nos genes regulados positivamente em L8.

SÍMBOLO GENE	GENBANK/UNIGENE	EVALUE	SIMILARIDADE	GEN BANK BOVINO
SFRS11	NM_004768	0	92	NM_001075621.1
BIRC6	NM_016252	0	94	XR_042763.1
Socs1	NM_009896	0	84	XM_864316.2
CCL28	NM_019846	5e-121	85	NM_001101163.1
COL1A2	NM_000089	0	90	NM_174520.2
OPCML	NM_002545	0	86	NM_174407.2
FAT4	NM_024582	0	93	XM_001249785.1
ABCA2	NM_001606	0	90	XM_607004.2
CAMTA1	NM_015215	0	93	XM_610833.4
ERCC4	NM_005236			Nenhuma seqüência similar a <i>Bos taurus</i>
CDC14A	NM_003672	0	94	XM_001788188.1
SPOP	NM_001007226	0	95	NM_001075936.1
OSGEPL1	NM_022353	0	88	XM_592634.3
CYP26B1	NM_019885	0	92	XM_613518.3
Locus transcrito	BM462863			Nenhuma seqüência similar a <i>Bos taurus</i>
PECAM1	NM_000442	0	78	BC120068.1
WNT10A	NM_025216	0	88	NM_001099078.1
PDCD10	NM_007217	0	96	NM_001075259.1
ATP8A1	NM_006095	0	92	NM_174838.2
ARHGAP26	NM_015071	0	92	XM_618416.4
INPP5E	NM_019892	0	82	XM_582780.2
SET	NM_003011	0	92	BT030717.1
CDC2L6	NM_015076	0	91	XM_589209.4
Em múltiplos clusters				Nenhuma seqüência similar a <i>Bos taurus</i>
NKIRAS2	NM_001001349	0	92	NM_001075387.1
INSL4	NM_002195			Nenhuma seqüência similar a <i>Bos taurus</i>
LOC125893	BC063805	3e-136	73	XM_584865.4

Continua

Tabela 8. Similaridade das seqüências entre o genoma humano e bovino nos genes regulados positivamente em L8. Continuação

SÍMBOLO GENE	GENBANK/UNIGENE	EVALUE	SIMILARIDADE	GEN BANK BOVINO
ADAM12	NM_003474	0	85	NM_001001156.1
Pdia4	NM_009787	0	81	NM_001045879.1
OLR1	NM_002543			Nenhuma seqüência similar a <i>Bos taurus</i>
ATF7IP CDNA FLJ43113 fis	AK125103			Nenhuma seqüência similar a <i>Bos taurus</i>
TAF1B	NM_005680	0	85	NM_001075503.1
GPR44	NM_004778	0	89	XM_001254753.1
TIA1	NM_022037	0	95	NM_001076109.1
HIVEP2	NM_006734	0	88	XM_593747.4
POU2F3	NM_014352	0	91	XM_594648.4
AMOTL1	NM_130847	0	86	XM_615060.3
PRKRA	NM_003690	0	91	NM_001045870.1
PSMC1	BM542634	1e-132	88	BC123487.1
RASA1	NM_002890	0	92	NM_174449.2
EGFL6	NM_015507			Nenhuma seqüência similar a <i>Bos taurus</i>
TAF4	NM_003185	0	88	XM_001787927.1
TADA3L	NM_006354	0	88	NM_001024511.1
TBCC	NM_003192	0	83	NM_001075709.1
SGCB	NM_000232	0	86	NM_001102188.1
STRA6	NM_022369	0	84	NM_001075730.1
Ccl21a	NM_011335	0		Nenhuma seqüência similar a <i>Bos taurus</i>
MMD2	NM_198403	0	90	NM_001075870.1
ACVR2B	NM_001106	0	92	NM_174495.2
POLR1E	NM_022490	0	88	NM_001034408.1
PCDH11X	NM_014522	0	88	XM_581926.4
DEK	NM_003472	0	85	NM_001099717.1
APC	NM_000038	0	90	XM_001787597.1
CDNA FLJ39389 fis	AK123757	0	90	XM_617891.4

Continuar

Tabela 8. Similaridade das seqüências entre o genoma humano e bovino nos genes regulados positivamente em L8. Continuação

SÍMBOLO GENE	GENBANK/UNIGENE	EVALUE	SIMILARIDADE	GEN BANK BOVINO
Locus transcrito	BE739208			Nenhuma seqüência similar a <i>Bos taurus</i>
CCNG1	NM_004060	0	90	BC150004.1
XRCC4	NM_003401	0	86	NM_001081615.1
VDP	NM_003715	0	89	NM_174845.2
SF3B3	NM_012426	0	89	NM_001077851.1
TRAIP	NM_005879	0	89	NM_001102124.1
Stat3	NM_213659	0	89	NM_001012671.2
MYT1	NM_004535	0	89	XM_581853.3
AP3S2	NM_005829	0	92	NM_001075376.1
GRB14	NM_004490	0	92	NM_001011681.2
CREB3L2	NM_194071	0	84	NM_001102533.1
CYP19A1	NM_000103	0	84	U18447.1
MRPS6	NM_032476	2e-24	77	U95124.1
ATF5	NM_012068	0	86	XM_593712.4
MSX1	NM_002448	0	88	BC120208.1
TOPBP1	BG388593			Nenhuma seqüência similar a <i>Bos taurus</i>
CCBP2	NM_001296	0	83	BT021720.1
RAB14	NM_016322	0	87	NM_001130754.1
Stat4	NM_011487	0	88	XM_001787142.1
Lócus transcrito	BG121813	2e-136	88	NM_001034423.1
Dado não encontrado				Nenhuma seqüência similar a <i>Bos taurus</i>
RPS6KB1	NM_003161	0	96	NM_205816.1
PDCD4	NM_014456	0	91	NM_001083647.1
Prmt2	NM_133182	0	83	BC104629.1
PAK3	NM_002578	0	95	XM_001252145.2
DLG4	NM_001365	0	100	XM_001788643.1

Continuar

Tabela 8. Similaridade das seqüências entre o genoma humano e bovino nos genes regulados positivamente em L8. Continuação

SÍMBOLO GENE	GENBANK/UNIGENE	EVALUE	SIMILARIDADE	GEN BANK BOVINO
PDIA3	NM_005313	0	91	NM_174333.3
PLA2G5	NM_000929	5e-88	80	XM_866563.3
CCNI	NM_006835	0	90	NM_001083373.1
SYK	NM_003177	0	89	NM_001037465.1
CDA08	NM_030790	0	89	NM_001038532.1
EHMT1	NM_024757	0	83	NM_001099041.1
EFNB1	NM_004429	0	88	NM_001080299.1
Ide	NM_031156	0	88	NM_001075849.1
Tap1	NM_013683	0	77	BC149569.1
TFAM	NM_003201	0	82	NM_001034016.2
IFI27	NM_005532			Nenhuma seqüência similar a <i>Bos taurus</i>
CCBP2	NM_001296	0	83	BT021720.1
Itga4	NM_010576	0	82	NM_174748.1
FCGR2B	NM_004001	8e-105	77	DQ868526.1
ECEL1	NM_004826	0	90	XR_028602.2
BTG2	NM_006763	0	84	XM_586687.3
RAB7B	NM_177403	0	86	NM_001078013.1
BZRAP1	NM_004758	0	85	XM_001790622.1
HGF	NM_000601	0	91	NM_001031751.1

Conclusão:

6.5 Validação dos resultados do arranjo

Desenho das seqüências de oligonucleotídeos

Os genes selecionados para estudo foram alguns modulados positivamente nos embriões do grupo L8 em relação ao grupo R8, incluindo o fator de transcrição TAF1B (Figura 25). A survivina não estava presente na membrana do arranjo, mas foi incluída neste trabalho pela sua presença e função em embriões bovinos no estágio pré-implantação relatadas por Park e colaboradores (2007) e sua participação na mesma via metabólica que o BIRC6.

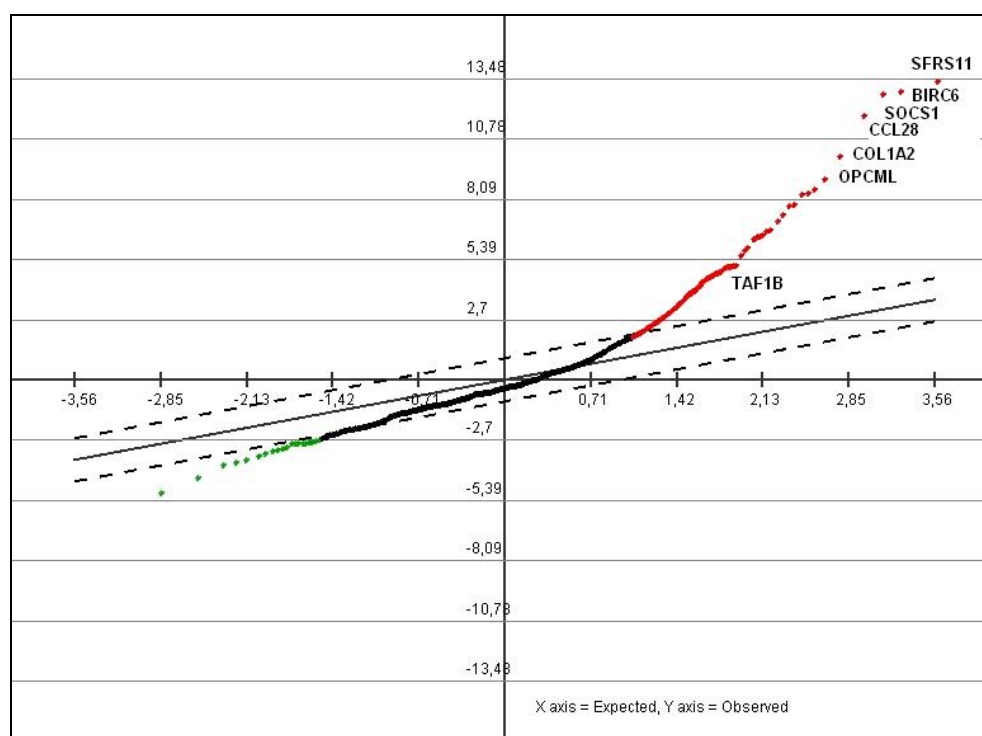


Figura 25. Gráfico de dispersão da diferença relativa observada e esperada, indicando a posição dos genes escolhidos para validação por PCR em Tempo Real.

Após a escolha dos genes de interesse diferencialmente modulados nas membranas, foram desenhados oligonucleotídeos para estes genes, utilizando os programas *Primer Premier v.5.00* (Biosoft International) e *Primer3*. Os parâmetros utilizados para o desenho dos oligonucleotídeos foram aqueles indicados pelo endereço eletrônico

<http://www.uic.edu/depts/rrc/cgf/realtime/primer.html> e segundo Roux (1995). Os oligonucleotídeos foram desenhados, quando possível, para a inclusão de regiões contendo íntron na região amplificada pelos oligonucleotídeos, a fim de amplificar exclusivamente cDNA e evitar a contaminação por DNA genômico. O iniciador para identificação do gene SFRS11 contém um íntron de cerca de 6.300 pb, para o gene BIRC6 há um íntron de cerca de 1.000 pb na seqüência do antisenso, próximo à terminação 3' do mesmo. Já para o gene SOCS1, não há íntron na sua seqüência de 1.123 pb publicada nos bancos de dados. A região amplificada pelos *primers* do CCL28 apresenta um íntron de cerca de 3.380 pb, assim como no caso do COL1A2, há um íntron de aproximadamente 700 pb, e do TAF1B, com um íntron de cerca de 6.100 pb. Apenas para o gene do OPCML não foi possível o desenho do par de *primers* em região contendo íntron pelo fato deste gene ter duas variantes, limitando as opções de região de ligação dos oligonucleotídeos àquelas cuja similaridade entre as variantes foi de aproximadamente 100%. O par de oligonucleotídeos para identificação da Survivina apresenta um íntron de 1.560 pb.

Os genes utilizados como controle endógeno foram o GAPDH, a H2A.z (*H2A histone family, member Z*) e o SDHA (*Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit A*; GOOSSENS et al., 2007, 2005; VIGNEAULT et al., 2007). Para fins de cálculo da regulação relativa, o GAPDH foi utilizado como gene de referência por apresentar a melhor eficiência de reação e menor variação de regulação que a H2A.z e o SDHA. Apesar de alguns autores não acreditarem que este seja um bom controle endógeno para estudos em embriões no estágio de pré-implantação por não manter os níveis de regulação constante entre os diferentes estádios (BUSTIN, 2002; ROBERT et al., 2002), trabalhos recentes utilizam o GAPDH como controle endógeno (BALASUBRAMANIAN et al., 2007; GOOSSENS et al., 2007; MISIRLIOGLU et al. 2006).

6.5.1 Amplificação dos genes selecionados por PCR em Tempo Real (RT-PCR)

Todos os *primers* foram testados em relação a diferentes concentrações na reação e para ausência de contaminação em PCR convencional, utilizando cDNA de placenta como teste. A figura 26 mostra um exemplo de gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo (0.5 µg/mL de gel) para visualização de fragmentos amplificados dos *primers* SOCS1 (110 pb) e CCL28 (130 pb) para 50 nM e 250 nM de concentração e 58°C e 60°C de temperatura.

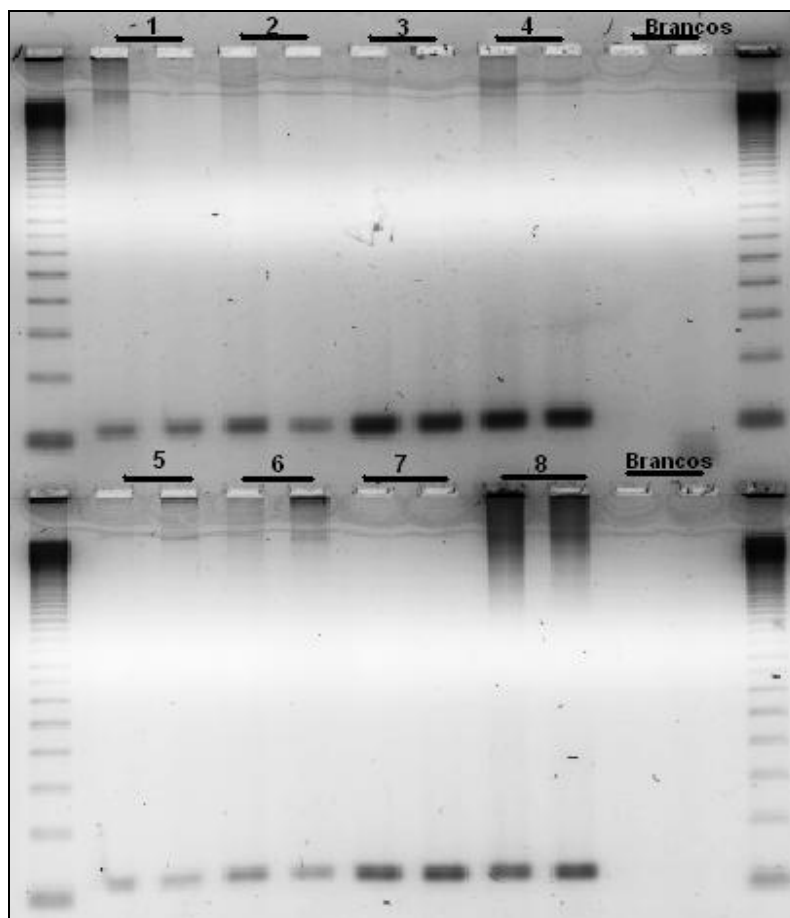


Figura 26. Fotografia do gel de agarose 1% para avaliação de amplificação do produto de PCR dos genes SOCS1, em duplicata (porção superior do gel) e CCL28, em duplicata (porção inferior do gel). Linha 1. SOCS1 – 50 nM – 58°C. Linha 2. SOCS1 – 50 nM – 60°C. Linha 3. SOCS1 – 250 nM – 58°C. Linha 4. SOCS1 – 250 nM – 60°C. Linha 5. CCL28 – 50 nM – 58°C. Linha 6. CCL28 – 50 nM – 60°C. Linha 7. CCL28 – 250 nM – 58°C. Linha 8. CCL28 – 250 nM – 60°C. Marcador de 100 pb.

Após testes em PCR convencional, foi determinada a temperatura de 60°C como temperatura ideal de anelamento para todos os pares de *primers*. Em seguida, foram feitas curvas de amplificação para todos os *primers* utilizando diluições de 400 nM, 300 nM, 200 nM e 100 nM, como exemplificado na figura 27, para o gene GAPDH. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% e pela análise do perfil de amplificação em RT-PCR e pela quantificação das bandas em gel de agarose, com auxílio do programa *Image Gauge* versão 3.12 (Fuji Film), foi determinado que 200 nM seria a concentração suficiente para todos os *primers*. Além disso, foram testadas diferentes concentrações de cDNA, variando de 0,75 embrião/reação a 1,66 embrião/reação.



Figura 27. Curva de amplificação em Tempo Real para o gene GAPDH em teste de concentração de *primer*.

As figuras 28 e 29 mostram as curvas de dissociação para todos os oligonucleotídeos testados neste experimento.

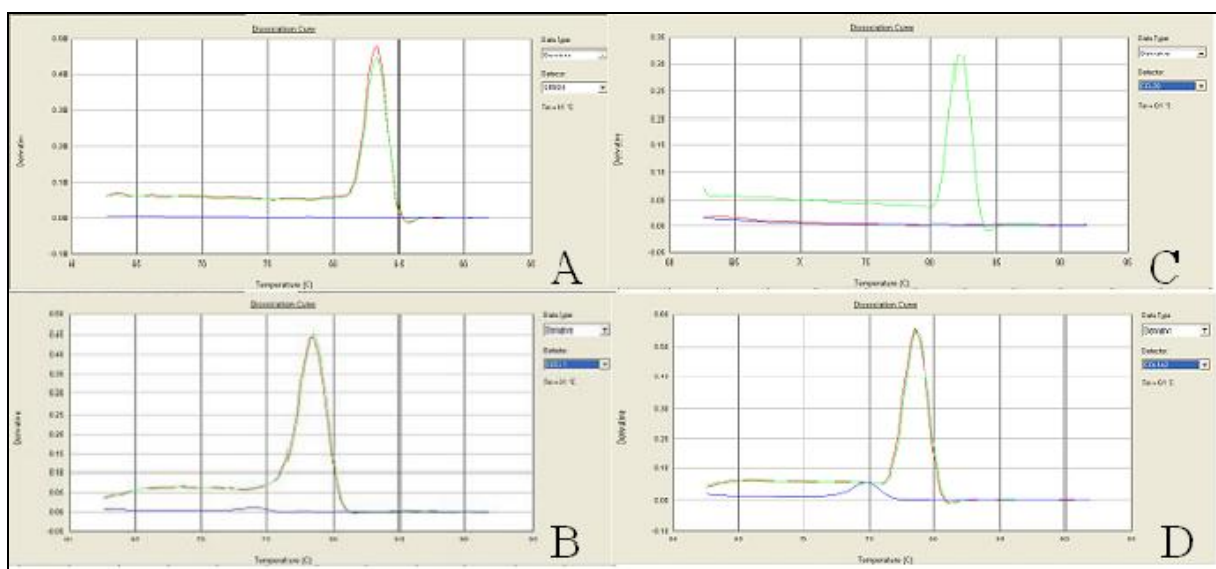


Figura 28. Curva de Dissociação para avaliação da especificidade da amplificação dos *primers* SFRS11(A), SOCS1 (B), CCL28 (C) e COL1A2 (D).

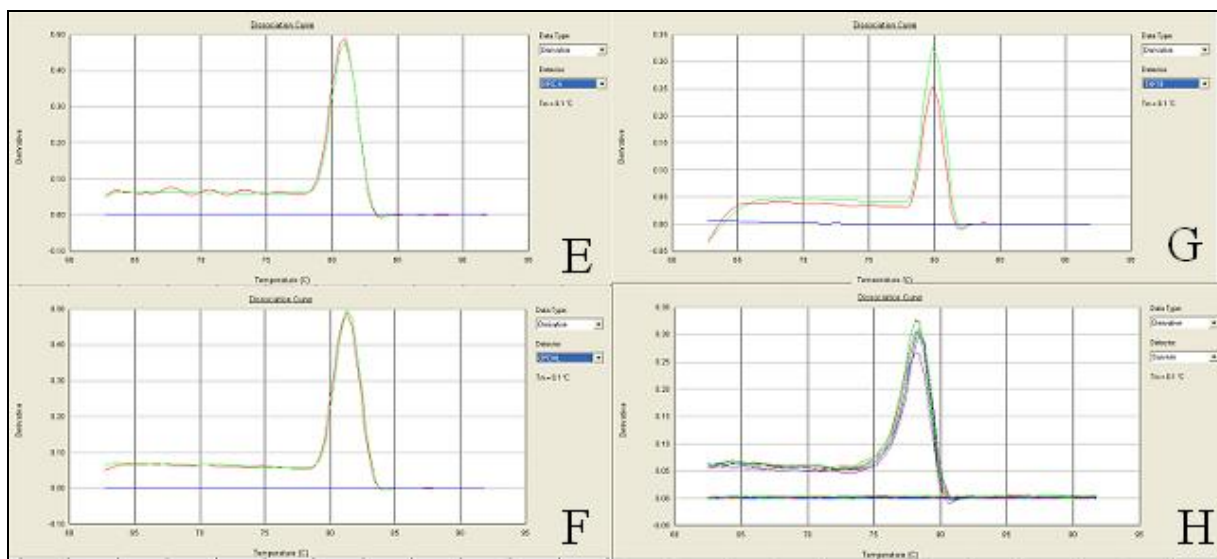


Figura 29. Curva de Dissociação para avaliação da especificidade da amplificação dos *primers* BIRC6 (E), OPCML (F), TAF1B (G) e Survivina (H).

O número de ciclos de amplificação de cada amostra suficiente para atingir o *threshold* foi normalizado com o CT obtido para o gene GAPDH, fornecendo um valor normalizado. Como o valor de CT é inversamente proporcional à quantidade de cDNA inicial, valores maiores significam menor quantidade de transcritos e vice-versa. Foram realizadas as reações de PCR em Tempo Real, utilizando cada *pool* de 75 embriões (3 a 5 repetições de cada grupo para cada gene) e como gene endógeno o GAPDH. Cada reação foi cuidadosamente analisada quanto à curva de amplificação e dissociação. Em nenhuma reação houve amplificação para o *primer* do CCL28 e, devido à ausência de amplificação para este oligonucleotídeo em todas as repetições nos embriões, este foi retirado da análise estatística. Apesar de este gene estar altamente modulado no arranjo, foi considerado que tenha sido um falso positivo. Possivelmente, a amplificação do RNA tenha sido responsável por este falso positivo, pela diminuição do tamanho dos fragmentos de cDNA oriundos do aRNA, característica inerente do processo de amplificação do RNA (PARK et al., 2004). Esta diminuição do tamanho do fragmento amplificado poderia levar a uma ligação deste a regiões similares a cDNAs depositados na membrana, levando a casos de falsos positivos.

A tabela 9 mostra os valores para limiar de fluorescência (CT) médios, sem normalização, para o grupo de embriões R8 e L8 em cada gene.

Tabela 9. Média de CTs (*cycle threshold*) não normalizados dos embriões dos grupos R8 e L8 para todos os pares de oligonucleotídeos analisados.

Par de primers	R8	L8
	CT médio	
SFRS11	31,6	38,4
SOCS1	34,8	39,5
COL1A2	35,8	41,0
BIRC6	29,8	29,6
OPCML	45,8	46,3
TAF1B	41,0	46,5
SURVIVINA	42,4	47,3
GAPDH	30,9	31,6

Quanto ao método de amplificação do aRNA, foram comparados os aRNAs de primeira e segunda etapa, oriundos de embriões dos grupos R8 e L8 que estavam conservados a -80°C , para os genes SOCS1, OPCML, TAF1B e GAPDH. O aRNA de terceira etapa, que foi utilizado como sonda para o experimento de hibridação, não pôde ser testado devido ao término do mesmo. Assim, foram testados apenas os aRNAs de embriões do grupo R8 e L8, amplificados em uma ou duas etapas. Cada amostra foi testada em quadruplicata para cada gene, e os valores de CT médios para cada gene estão na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de CTs médios para os aRNAs amplificados em uma ou duas etapas nos grupos R8 e L8.

CT / Genes	aRNA R8 1 etapa	aRNA L8 1 etapa	aRNA R8 2 etapa	aRNA L8 2 rounds
SOCS1	32,2	29,8	27,8	27,7
OPCML	39,9	45,8	42,3	37,7
TAF1B	42,9	40,4	29,7	32,6
GAPDH	36,4	34,4	29,3	30,2

À exceção da amostra de aRNA de embriões do grupo R8 para o gene OPCML, que teve aumento de CT com a realização da segunda etapa de amplificação do RNA, todas as amostras mostraram que a amplificação do RNA é um método que promove o aumento da quantidade inicial de RNA, como demonstrado na literatura (BAUGH et al., 2001; GOMES et al.,

2003; JENSON et al., 2003; LI et al., 2004; PARK et al., 2004; PATEL et al., 2005; STOYANOVA et al., 2004; WANG E. et al., 2000; WANG, 2005; ZHU; XU; BABA, 2006).

Quando são comparados os valores de CT das amostras que passaram pela amplificação em uma etapa, em relação àquelas que foram obtidas sem amplificação de aRNA (Tabela 9), houve diminuição de CT (ou seja, aumento da concentração de RNA inicial), exceto para os genes TAF1B em embriões R8 e para o endógeno GAPDH independente do grupo embrionário. Nestes casos, o procedimento de amplificação, ao contrário do esperado, mostrou diminuição da concentração de RNA testado.

Quando comparados os valores de CTs das amostras sem amplificação de RNA com aquelas que passaram por duas etapas de amplificação, em todos os casos a amplificação aumentou efetivamente a concentração de RNA.

A análise das membranas marcadas com RNA embrionário amplificado em três etapas evidenciou maior modulação dos genes SOCS1, OPCML e TAF1B em embriões do grupo L8 quando comparados a embriões do grupo R8. Ao avaliar os valores de CTs dos RNAs após as amplificações, este padrão de maior modulação em embriões L8 é confirmado, para os três genes. Para os genes SOCS1 e TAF1B, há maior modulação no grupo L8 com uma única etapa de amplificação, sendo que esta modulação é inversa quando realizadas duas fases de amplificação. Ou seja, entre a primeira e a segunda etapa de amplificação houve alteração na proporção dos transcritos (LI et al, 2004; ROBERT et al., 2002; PATEL et al, 2005). As hibridações foram realizadas com estas mesmas amostras de RNA, porém, com uma terceira etapa de amplificação, confirmando uma maior modulação destes genes em embriões L8, similar ao demonstrado com apenas uma única fase de amplificação.

A maior modulação para o gene OPCML em embriões L8 foi evidenciada após duas etapas de amplificação, assim como encontrado nos resultados de hibridação, após três fases de amplificação.

Análise Estatística

A eficiência das reações de PCR Tempo Real foi estimada utilizando a regressão linear do logaritmo da fluorescência em cada ciclo pelo programa *LinRegPCR* (RAMAKERS et al., 2003). A partir dos dados de eficiência da reação de cada uma das amostras foi calculada a média da eficiência da reação de PCR para cada gene. O limiar de fluorescência (*threshold*) foi fixado na média dos valores extremos de fluorescência calculados pelo programa *LinRegPCR*,

garantindo assim que os *cycle threshold* (CTs) adquiridos encontravam-se dentro da reta de eficiência conhecida (Tabela 11).

Tabela 11. Eficiência média da reação e desvio padrão da eficiência para os genes analisados.

	E média	Desvio padrão
SFRS11	1,89	0,05
SOCS1	1,81	0,27
COL1A2	1,93	0,04
BIRC6	1,97	0,04
OPCML	1,73	0,15
TAF1B	1,95	0,04
SURVIVINA	1,92	0,12
GAPDH	1,93	0,05

Os valores médios de eficiência foram utilizados para cálculo da razão de regulação relativa (rER), que utilizou a comparação de CTs entre os genes alvos e o endógeno GAPDH para o grupo L8 em relação ao grupo R8 (grupo controle) e calibrados com um indivíduo do grupo rápido (SCHEFE et al., 2006). Os valores de rER foram transportados para o programa SAS e comparados um a um para cada gene pelo teste t-student, considerando $p < 0,05$ e com exclusão dos valores além de 2 desvios-padrão da média, o que resultou na exclusão de apenas um valor para o gene OPCML (Tabela 12).

Tabela 12. Valores de razão de expressão relativa (rER) médios dos transcritos e desvio-padrão para cada grupo de embrião (R8 e L8) e valores de p, considerando significativo $p < 0,05$.

Gene	Grupo	rER \pm DP	P
SFRS11	R8	2,59 \pm 3,38	0,50
	L8	1,19 \pm 1,97	
SOCS1	R8	4,39 \pm 3,00	0,15
	L8	1,24 \pm 1,51	
COL1A2	R8	0,68 \pm 0,60	0,16
	L8	0,12 \pm 0,18	
BIRC6	R8	1,72 \pm 2,34	0,66
	L8	2,14 \pm 2,08	

OPCML	R8	$0,25 \pm 0,49$	0,40
	L8	$0,06 \pm 0,11$	
TAF1B	R8	$7,71 \pm 10,11$	0,42
	L8	$3,38 \pm 7,55$	
SURVIVINA	R8	$0,33 \pm 0,47$	0,21
	L8	$0,02 \pm 0,04$	

Avaliando-se a regulação relativa dos transcritos dos genes analisados no grupo de embriões L8 em comparação ao grupo controle R8, não houve diferença significativa nos valores encontrados ($p > 0,05$) para quaisquer genes entre embriões de desenvolvimento lento (L8) e rápido (R8) (Figura 30).

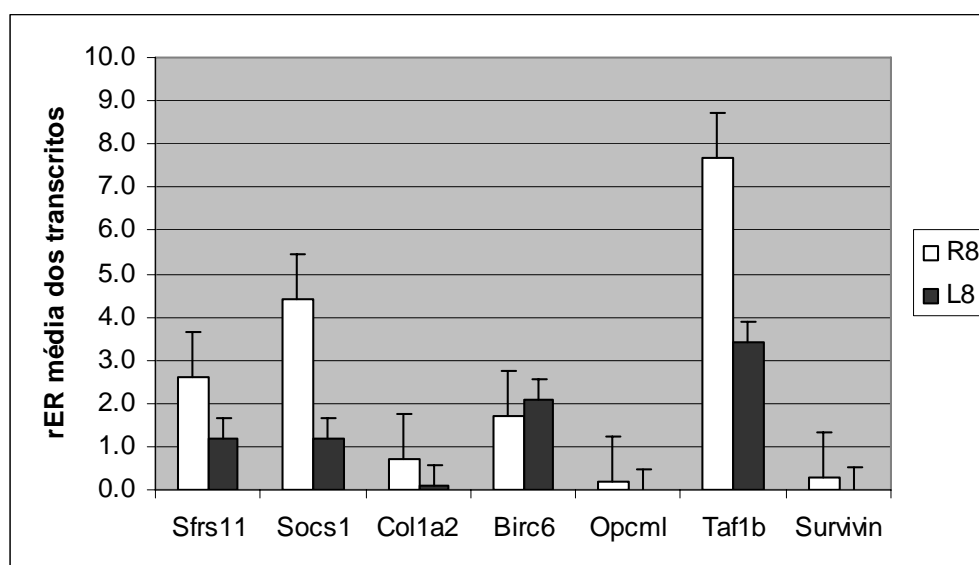


Figura 30. Regulação relativa dos transcritos (rER) dos genes SFRS11, SOCS1, COL1A2, BIRC6, OPCML, TAF1B e Survivina nos embriões do grupo de desenvolvimento rápido (R8) e lento (L8).

Assim, de acordo com esta análise dos resultados de amplificação pelo PCR em Tempo Real, não foi possível confirmar a regulação diferencial entre os embriões 8 células de desenvolvimento lento e rápido, identificadas nas membranas do arranjo. Esta ausência de

confirmação dos resultados de hibridação pelo PCR em Tempo Real pode refletir variações induzidas na proporção de transcritos devido às três etapas de amplificação do aRNA, superestimando as concentrações destes transcritos mais comuns nas amostras ou aumentando o número de transcritos diferencialmente regulados (LI et al, 2004; ROBERT et al., 2002; PATEL et al, 2005). Apesar do tamanho dos fragmentos e a variabilidade destes ser maior na amplificação linear que na exponencial (WADENBÄCK et al., 2005), o tamanho destes transcritos é dramaticamente reduzido entre a primeira e a segunda etapa de amplificação (PARK et al., 2004). Neste estudo foram realizadas três etapas de amplificação, para obtenção de concentração suficiente de aRNA para hibridação, o que provavelmente levou a uma grande diminuição dos fragmentos. Como já citado anteriormente, quando comparados os CTs das amostras de RNA amplificado, foi possível observar a alteração no padrão de modulação entre a primeira e a segunda etapa, o que confirma a alteração na proporção dos transcritos (LI et al, 2004; ROBERT et al., 2002; PATEL et al, 2005).

Contudo, a amplificação de RNA é um método de extrema necessidade em estudos envolvendo quantidades limitadas de amostra, como no caso de embriões bovinos, sendo inviáveis estudos de expressão gênica em larga escala sem a aplicação deste método (ADJAYE et al., 2007; ARONOW; RICHARDSON; HANDWERGER, 2001; CHEN et al., 2005; ELLESTAD et al., 2006; FAIR et al., 2007; GINSBERG, 2005; GOMES et al., 2003; JENSON et al., 2003; JEONG et al., 2006; JONES et al., 2008; KATO et al., 2007; LI; CUI; KIM, 2006; MAMO et al., 2006a, 2006b; MISIRLIOGLU et al., 2006; PATEL et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2004; SIRARD et al., 2005; STOYANOVA et al., 2004; ZHU; XU; BABA, 2006). No caso de embriões na fase de AGE, a amplificação do RNA permite análises no momento de menor concentração de RNA, quando estes embriões estão degradando o mRNA materno e iniciando a transcrição do seu próprio genoma. A aplicação de membrana heteróloga, apesar do alto índice de similaridade entre as espécies, também pode ser um agravante na obtenção de resultados satisfatórios, apesar de alguns grupos terem conseguido bons resultados com este tipo de hibridação (ADJAYE et al., 2004; DALBIÈS-TRAN e MERMILLOD, 2003; SIQUEIRA et al., 2004; VALLÉE et al., 2006).

Outro ponto da não validação por PCR em Tempo Real é a grande variabilidade individual presente dentro do mesmo grupo embrionário, separado pelo mesmo critério (BIASE et al., 2008; METCALF et al., 2003). Entre os embriões R8, 58% chegarão até o estágio de blastocisto, mas 42% não irão atingir este estágio, havendo um bloqueio mesmo nestes embriões com maior propensão ao desenvolvimento. No grupo L8, 34% atingirão o estágio de blastocisto, e 66% sofrerão o bloqueio (WATANABE et al., 2002). Ou seja, quando foi realizada

a separação dos grupos às 48 hpi (R8) ou 90 hpi (L8), supostamente seriam separados aqueles com maior propensão ao desenvolvimento, no caso do grupo R8, ou ao bloqueio, no caso do grupo L8, pela maior proporção destes casos naqueles grupos. Entretanto, possivelmente também foram separados como R8 alguns daqueles embriões que representariam 42% das amostras, ou seja, que sofreriam o bloqueio, assim como pode ter ocorrido de forma contrária para o grupo L8. O estado de poliadenilação dos transcritos também está associado à competência ao desenvolvimento e à velocidade das clivagens (BREVINI et al., 2002). Se ocorre maior degradação de RNAs em embriões com menor potencial, este fato também deve ser levado em consideração na comparação de embriões de qualidades distintas (DODE et al., 2006). Apesar da formação do *pool* diminuir a variação individual, quando há heterogeneidade de transcritos dentro do mesmo grupo embrionário, o agrupamento em *pools* pode levar à diluição dos fatores mais raros e à concentração dos fatores mais comuns. Na formação dos grupos para a amplificação do RNA também existiria este efeito de diluição dos transcritos raros e concentração de transcritos comuns, mas com a diminuição do tamanho dos fragmentos inerente à técnica, esta proporção de transcritos raros e comuns poderia ter sido alterada, levando à amplificação preferencial dos novos transcritos comuns.

Certamente outra questão a ser discutida é a intensa variabilidade genética associada às alterações ambientais na produção de embriões bovinos *in vitro*. O período de maturação oocitária, a cinética das primeiras clivagens, a AGE, a compactação e a formação do blastocisto são afetadas pelas condições de cultivo e pelo procedimento em si, resultando em alterações na expressão gênica em oócitos e embriões (RIZOS et al., 2002; LONERGAN et al., 2003; WRENZYCKI et al., 2005; DURANTHON et al., 2008; RIZOS ET AL., 2008). Neste experimento, a produção de embriões sofreu alterações de meios de cultivo e manipulação no ambiente de cultivo, devido aos embriões utilizados para as hibridações terem origem diferente daqueles produzidos para as reações de PCR em Tempo Real. Ou seja, houve uma produção de embriões específica, sem a amplificação do RNA para a realização do PCR em Tempo Real.

Outra consideração é a escolha do gene endógeno em experimentos envolvendo embriões na fase pré-implantação. O pré-requisito para a normalização seria a manutenção dos níveis de expressão do gene endógeno utilizado, independente do estágio embrionário ou das condições experimentais (JEONG et al., 2005). Entretanto, há grande variação da quantidade de mRNA em embriões pré-implantação (BIASE et al., 2008; BREVINI et al., 2002; CUI; KIM, 2007; GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; VIGNEAULT et al., 2007), incluindo os genes endógenos caracterizados em outros tecidos, devido à dinâmica da expressão gênica neste período (BILODEAU-GOESEELS; SCHULTZ, 1997). Até então, os resultados são contraditórios em

relação a qual o melhor gene para normalização no PCR em Tempo Real. Alguns autores não utilizam o GAPDH pela inconstância de expressão do mesmo em estudos pré-implantação (BUSTIN, 2002; ROBERT et al., 2002), enquanto outros acreditam que o GAPDH é um bom controle endógeno (BALASUBRAMANIAN et al., 2007; MISIRLIOGLU et al. 2006). Há uma corrente que sugere a utilização de uma média geométrica entre três endógenos (GOOSSENS et al, 2007; GOOSSENS et al, 2005) ou utilização da H2A (JEONG et al., 2005; ROBERT et al., 2002; VIGNEAULT et al., 2007). No presente estudo, foram utilizados o GAPDH, a H2A.z e o SDHA. Entretanto, o SDHA foi descartado, pois apresentou uma baixa frequência ou ausência de expressão nas amostras analisadas. A H2A.z mostrou amplificação para todas as amostras, porém, a eficiência da reação foi menor que para o GAPDH, e a variação da curva de expressão foi maior. Portanto, neste caso, foi escolhido o GAPDH como o melhor endógeno entre os testados. Não foi possível para fins de cálculo utilizar a média entre GAPDH e H2A.z pois a metodologia adotada (SCHEFE et al., 2006) não permite a utilização de mais de um endógeno. A utilização do GAPDH como endógeno e a metodologia de acordo com Scheffe e colaboradores (2006) podem não ser as ideais neste tipo de estudo. No entanto, há que se ponderar que embora seja a melhor maneira de se estimar a frequência de um determinado mRNA em amostras de embrião, pela questão essencial da necessidade de genes constitutivos, o PCR pode estar sujeito a falhas.

Apesar da não confirmação dos resultados dos arranjos pela PCR em Tempo Real, o padrão de modulação para três genes analisados nas amostras de RNA que passaram por uma ou duas fases de amplificação mostrou o mesmo resultado que aquele encontrado nas hibridações, ns quais foi utilizado uma terceira etapa de amplificação das amostras. Assim, a modulação superior em embriões do grupo L8 encontrada nos arranjos reflete a modulação realmente presente naquele grupo de embriões utilizados no experimento de hibridação.

6.5.2 Construção de mapas de regulação gênica (*pathways*)

Uma possível maneira de se testar os valores de um arranjo e buscar efeitos semelhantes de diferenças de regulação em genes envolvidos em vias de sinalização é a construção de redes de regulações gênicas. Neste trabalho, os resultados do arranjo foram submetidos à construção de redes de regulações gênicas utilizando o programa MetaCore (GeneGo), que é baseado em informações de banco de dados de vias de sinalização próprios além do *Gene Ontology* para elaboração dos mapas.

Para busca de mapas de regulação gênica nos quais houvesse a inclusão dos genes identificados pelo arranjo foram utilizadas as palavras-chave *apoptosis* e *programmed cell death*. Nestes mapas de regulação gênica foram identificados vários genes presentes nos arranjos, mas com especial atenção para vias de sinalização envolvendo principalmente o BIRC6 (Figura 31), o SOCS1 (Figura 32) e o COL1A2 (Figura 33), por estarem envolvidos diretamente em vias de sobrevivência celular e MCP.

Dados obtidos em nosso laboratório com a aplicação das metodologias de Cometa e TUNEL em embriões de desenvolvimento rápido (oito células às 48hpi) e lento (oito células às 90hpi) mostraram que estes embriões lentos apresentaram maior taxa de exposição da fosfatidilserina e fragmentação celular, correlacionando MCP e bloqueio do desenvolvimento (GARCIA, 2004). Experimentos posteriores, pela aplicação da metodologia de DD-PCR (*Differential Display PCR*) e PCR em Tempo Real identificaram um grande número de transcritos diferencialmente modulados em embriões 8 células, incluindo genes importantes cuja transcrição diferencial está associada a mecanismos de sobrevivência e MCP em embriões bovinos, sugerindo uma relação com o bloqueio ou ainda com a AGE (FIGUEIREDO, 2005). Neste trabalho, os resultados com hibridação em arranjos demonstraram modulação gênica diferencial em 120 genes, sendo 20 genes mais modulados em embriões do grupo R8 e 100 genes mais modulados em embriões L8, corroborando Figueiredo (2005), que encontrou grande quantidade de transcritos mais modulados em embriões L8 e Jeong e colaboradores (2006), que encontraram grande parte dos genes mais expressos em embriões bloqueados de camundongos.

Na figura 31 é possível observar a presença da PI3K, que é responsável pela regulação de muitos processos biológicos, como o crescimento, sobrevivência, proliferação e metabolismo celular. A PI3K catalisa a conversão de fosfoinosítideo bifosfato em trifosfato (PtdIns 3,4,5 P3). Estes lipídeos recrutam a proteína Akt/Pkb (*protein kinase B*) e PDK1 (*3-phosphoinositide*

dependent protein kinase-1) para a membrana plasmática. Akt/Pkb é então fosforilado e regulado positivamente por PDK1, e em seguida Akt/Pkb fosforila a proteína pró-apoptótica Bad (*Bcl-2-antagonist of cell death*) e caspase 9, entre outras proteínas, bloqueando a indução de MCP por estes fatores e promovendo a sobrevivência celular (CRADDOCK et al., 1999; WYMANN; ZVELEBIL; LAFFARGUE, 2003). Neste trabalho, a PI3K não estava presente no arranjo, portanto, não foi possível validar a sua transcrição diferencial, mas esta foi detectada em embriões 8 células em dados anteriores no laboratório (FIGUEIREDO, 2005).

A mitocôndria participa da MCP pelas mudanças de permeabilidade da membrana mitocondrial, com liberação de fatores indutores de MCP, como o citocromo c, no citoplasma. O citocromo-c liberado pela mitocôndria interage com a proteína Apaf-1 e a pró-caspase 9, formando um complexo conhecido por apoptossomo. Com a ativação da caspase-9, esta ativa as caspases efetoras 3 e 7 (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; DANIAL; KORSMEYER, 2004; GREEN; EVAN, 2002; GREEN; REED, 1998; GUPTA, 2003; HAJRA; LIU, 2004; OPIELA et al., 2008). Na análise da rede de regulação (Figura 31), estão presentes o gene BIRC6 e seus reguladores Smac/Diablo e HTR2A. O produto do gene BIRC6 (também conhecido como BRUCE ou Apollon) é uma proteína da família das IAPs (inibidores de MCP) caracterizada pela presença de um domínio de cerca de 70 a 80 aminoácidos, denominado *baculoviral IAP repeat* (BIR). BIRC6 facilita a degradação das proteínas apoptóticas Smac/Diablo e caspase-9 pela ubiquitinação (HAO et al., 2004; MARTIN, 2004), inibindo a MCP mediada pela via mitocondrial. Entretanto, muitas proteínas são responsáveis pela inativação destas IAPs e conseqüente promoção da MCP. A proteína Smac/Diablo, além de ser regulada pela proteína BIRC6, também é capaz de inibir esta regulação, interagindo com BIRC6 no citoplasma e bloqueando a função anti-apoptótica desta. Além de Smac/Diablo, HTR2A/Omi é outra proteína de origem mitocondrial que atua na inibição das IAPs. Entretanto, ao contrário de Smac/Diablo, Htr2A/Omi não é só capaz de inibir as IAPs, mas sua atividade serina protease facilita também a MCP (DANIAL; KORSMEYER, 2004; GUIMARÃES; LINDEN, 2004; QIU; GOLDBERG, 2005; REN et al., 2005). Na ausência de função fisiológica do BIRC6 pela ligação a qualquer molécula inibidora, ou em estudos com embriões mutantes com deleção da proteína BIRC6, há um aumento da proteína pró-apoptótica Bax, que é regulada pela proteína pró-apoptótica p53. Além disso, foi observado um aumento da caspase-2, que é regulada pelo Pidd (*leucine-rich repeats and death domain containing*), cuja regulação também está sob controle da p53 (REN et al., 2005). A ativação de Bax e da caspase-2 é essencial para a permeabilização da membrana mitocondrial necessária à MCP, resultando na liberação de citocromo c e ativação da caspase 9. Assim, BIRC6 é um regulador superior a p53, e conseqüentemente, da sinalização apoptótica

via mitocôndria, sendo relatada como proteína essencial para o desenvolvimento embrionário em camundongos. Entretanto, BIRC6 não parece estar envolvida na sinalização para sobrevivência de PI3K/Akt (LOTZ; PYROWOLAKIS; JENTSCH, 2004; REN et al., 2005) nem a p53 parece estar ligada ao bloqueio embrionário (FAVETTA et al., 2007; 2004; MATWEE; BETTS; KING, 2000).

Além de BIRC6, foram identificados no arranjo mais 7 genes diferencialmente modulados que estão sinalizados com um círculo rosa na figura 31. Um destes genes é o GRB14 (*growth factor receptor bound protein 14*). A família de proteínas adaptadoras GRB são ligantes a receptores de fatores de crescimento, entre eles o receptor da insulina (IR) e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF; HEMMING et al., 2001). Ligantes de insulina resultam na sinalização por fosforilação do receptor de insulina. A família de substratos dos receptores de insulina (IRS) é um grupo de proteínas que reconhece o receptor de insulina fosforilado. A fosforilação estimulada pela insulina nas proteínas IRS induz a associação da subunidade regulatória da PI3K, e conseqüentemente resulta em aumento da atividade desta. Assim, a ligação das proteínas GRBs aos receptores de insulina resulta em alteração/inibição da sinalização PI3K/Akt pela quebra de associação física dos IRS com o receptor de insulina. O gene para o receptor de insulina estava presente na membrana, mas sua regulação não foi estatisticamente significativa neste trabalho. Pela inibição da sinalização via IRS/PI3K, há redução da fosforilação de Akt. Estudos em humanos identificaram que altos níveis de proteína e mRNA de GRB14 estão associados a diabetes insulino-resistente em humanos (HEMMING et al., 2001; HOLT; SIDDLE, 2005; WICK et al., 2003). A ligação das GRBs aos IRs também inviabilizam a ativação da cascata Erk/MAPK (*extracellular signal regulates kinase/mitogen activated protein kinase*), além de inibir a síntese de glicogênio mediada pela insulina, a fosforilação do fator de transcrição Elk1 (membro da família ETS de oncogenes), a síntese do DNA e progressão do ciclo celular (HOLT; SIDDLE, 2005; LANGLAIS et al., 2004). Assim, as proteínas GRB atuam como reguladoras negativas de eventos metabólicos e mitogênicos mediados pela insulina (LANGLAIS et al., 2004). Estudos também correlacionam a família GRB à migração de células neuronais no desenvolvimento embrionário (MANSER; WOOD, 1990). Pela análise da figura 31, é possível ver que há uma ligação dos fosfoinosítídeos trifosfatados (PtdIns 3,4,5 P3) a GRB14.

Outro gene diferencialmente modulado e presente no arranjo é o LBC ou AKAP13 (*A kinase PRKA anchor protein 13*). As proteínas AKAPs têm a função de se ligarem à subunidade regulatória da proteína quinase A (PKA). O LBC está envolvido na transdução de sinal de muitos receptores envolvidos no sistema imune, como os receptores *Toll-like* (TLR), que são

reguladores essenciais no estímulo da imunidade inata, iniciando a cascata de sinalização que culmina com a ativação do NF- κ B (*Nuclear factor – kappaB*), de MAPKs e de fatores de resposta a interferons. O LBC tem um domínio que pode se ligar também a fosfoinositídeos trifosfatos, produtos da PI3K, mas não há relatos da presença de transcritos ou da proteína LBC em embriões (CHEN et al., 2004; SHIBOLET et al., 2007).

O NF- κ B é um fator de transcrição nuclear que regula a expressão de genes críticos para a MCP, tumorigênese, inflamação e várias doenças auto-imunes. A ativação do NF- κ B é parte de uma resposta ao estresse celular, com migração deste para o núcleo e ligação a vários genes anti-apoptóticos, incluindo aqueles da família Bcl-2, ativando sua transcrição para sobrevivência celular (NAGATA, 1997; VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003). A presença de LBC/AKAP13 nos embriões 8 células é mais um fator que leva a sugerir que estes embriões estariam ativando o genoma embrionário na tentativa de resgatá-los do bloqueio do desenvolvimento.

O produto do gene SET (*SET translocation myeloid leukemia associated*), também observado pela sua modulação diferencial no arranjo, está envolvido em processos biológicos como regulador negativo da MCP, inibidor de fosfatases, montagem do nucleossomo e regulador negativo da acetilação de histonas. Não há relatos na literatura a respeito da transcrição ou expressão de SET em embriões, apesar deste gene ser amplamente modulado em tecidos adultos. A proteína SET está presente em baixos níveis em células quiescentes durante a privação de soro, inibição de contato e diferenciação (SOURCE, 2000). Apesar da ausência de estudos sobre SET, vê-se na figura 31 que este é uma proteína de ligação reguladora da caspase 9, das proteínas quinases NDPKA (*Nucleoside diphosphate kinase A*) e Aurora-A e do fator de transcrição KLF5 (*Krüppel-like transcription factor 5*). A NDPKA ou NM23 interage regulando a proteína pró-apoptótica p53, atuando como anti-apoptótica (CERVONI et al., 2006; CHARPIN et al., 1997). A proteína Aurora-A está envolvida na sinalização anti-apoptótica do NF- κ B, mostrando possíveis formas de sua participação na regulação negativa de MCP. A família de fatores de transcrição KLF (*Krüppel-like factor*) pode ativar ou reprimir diferentes genes implicados em processos de diferenciação, desenvolvimento, progressão do ciclo celular e carcinogênese (GUTIÉRREZ-AGUILAR et al., 2007). Nas figuras 31 e 33 é possível ver a regulação positiva do KLF5 sobre a transcrição do gene survivina.

O produto do gene TOPBP1 (*topoisomerase DNA II binding protein 1*) codifica uma proteína de ligação que interage com a topoisomerase II beta, o que mostra sua participação no bloqueio da replicação e nos *checkpoints* de reparo do DNA durante o ciclo celular. TOPBP1 é rapidamente fosforilada após exposição celular a radiações ionizantes, sugerindo que a

proteína é necessária à sobrevivência celular contra danos no DNA. Além disso, TOPBP1 está associada à inibição de MCP dependente do fator de transcrição E2F1 durante o *checkpoint* G1/S e após o dano ao DNA (XU et al., 2003; YAMANE; WU; CHEN, 2002). Pela figura 31 é possível ver que a proteína TOPBP1 interage com as proteínas quinases ATR (*ataxia-telanglectasia mutated and Rad3-related*) e c-Abl (*V-abl Abelson murine leukemia oncogene 1*), além das enzimas PARP-1 (*Poly ADP-Ribose polymerase*), TOP2 beta (*DNA topoisomerase II, beta isozyme*), BRM (subunidade ATPase do complexo SWI/SNF de remodelação da cromatina) e do fator de transcrição Miz-1 (*Myc-interacting zinc finger protein-1*). A ligação de TOPBP1 a PARP-1 inibe a ligação do TOPBP1 ao fator de transcrição Miz-1 (WOLLMANN et al., 2007).

O TOPBP1 é capaz de ativar o complexo ATR-ATRIP (*ATR interacting protein*) em resposta à replicação incompleta ou danos no DNA, levando à fosforilação de p53 (KUMAGAI et al., 2006; LEE; KUMAGAI; DUNPHY, 2007). O TOPBP1 também é capaz de se ligar e reprimir a transcrição da proteína pró-apoptótica c-Abl, que, por *feedback*, é capaz de inibir esta repressão transcricional por fosforilação do TOPBP1 (ZENG; HU; LI, 2005). A proteína c-Abl liga-se e ativa a p53, sendo necessária ao acúmulo desta em resposta a danos no DNA, pois inibe a ligação de moléculas que degradam p53 (LEVAV-COHEN et al., 2005). Ou seja, a presença do TOPBP1 reprime c-Abl e conseqüentemente p53, levando à manutenção da sobrevivência celular. Não existem relatos na literatura de presença de TOPBP1 em embriões de quaisquer espécies.

Outro gene diferencialmente modulado neste estudo em embriões no momento da AGE foi a SPOP (*speckle-type POZ protein*), cujo proteína modula a repressão transcricional da proteína pró-apoptótica DAXX6 (*death associated protein 6*; Figura 31). Não existem relatos na literatura da presença de SPOP em embriões. A proteína DAXX interage com as desacetilases de histonas e outras proteínas associadas a histonas. DAXX é capaz de se ligar ao domínio de morte do receptor do Fas, promovendo a MCP mediada por Fas pela ativação das JNKs. O produto do gene SPOP é capaz de reverter a repressão transcricional mediada por DAXX por um mecanismo desconhecido (KWONS et al., 2006; LA et al., 2004). A presença de transcritos de SPOP, possivelmente interagindo e inibindo a proteína DAXX6 e suas ligações com os receptores de morte celular seria um indicativo de ocorrência de AGE para sinalização de sobrevivência naqueles embriões com alto potencial de bloqueio .

A figura 31 e também a figura 33 mostram a modulação da proteína TIA-1, cujo produto atua em mecanismos de regulação pós-transcricional do mRNA, incluindo os genes para o receptor do fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGFR2) e o receptor do Fas (FasR;

McALINDEN et al., 2007). A ativação de Fas resulta na desfosforilação da proteína quinase FAST que interage com TIA-1, promovendo sua fosforilação e conseqüente modulação de sua atividade reguladora do *splicing* alternativo de FasR. Assim, Fas/FAST/TIA-1 são parte de um sistema regulatório de *feedback* que amplifica ou atenua os sinais apoptóticos (FÖRCH; VALCÁRCEL, 2001). TIA-1 também atua como silenciador traducional que regula a expressão de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*). Camundongos *knock-out* para TIA-1 e a proteína relacionada TIAR não suportam o desenvolvimento embrionário além do dia 7, indicando que estas proteínas devem estar presentes no desenvolvimento embrionário normal (PIECYK et al., 2000).

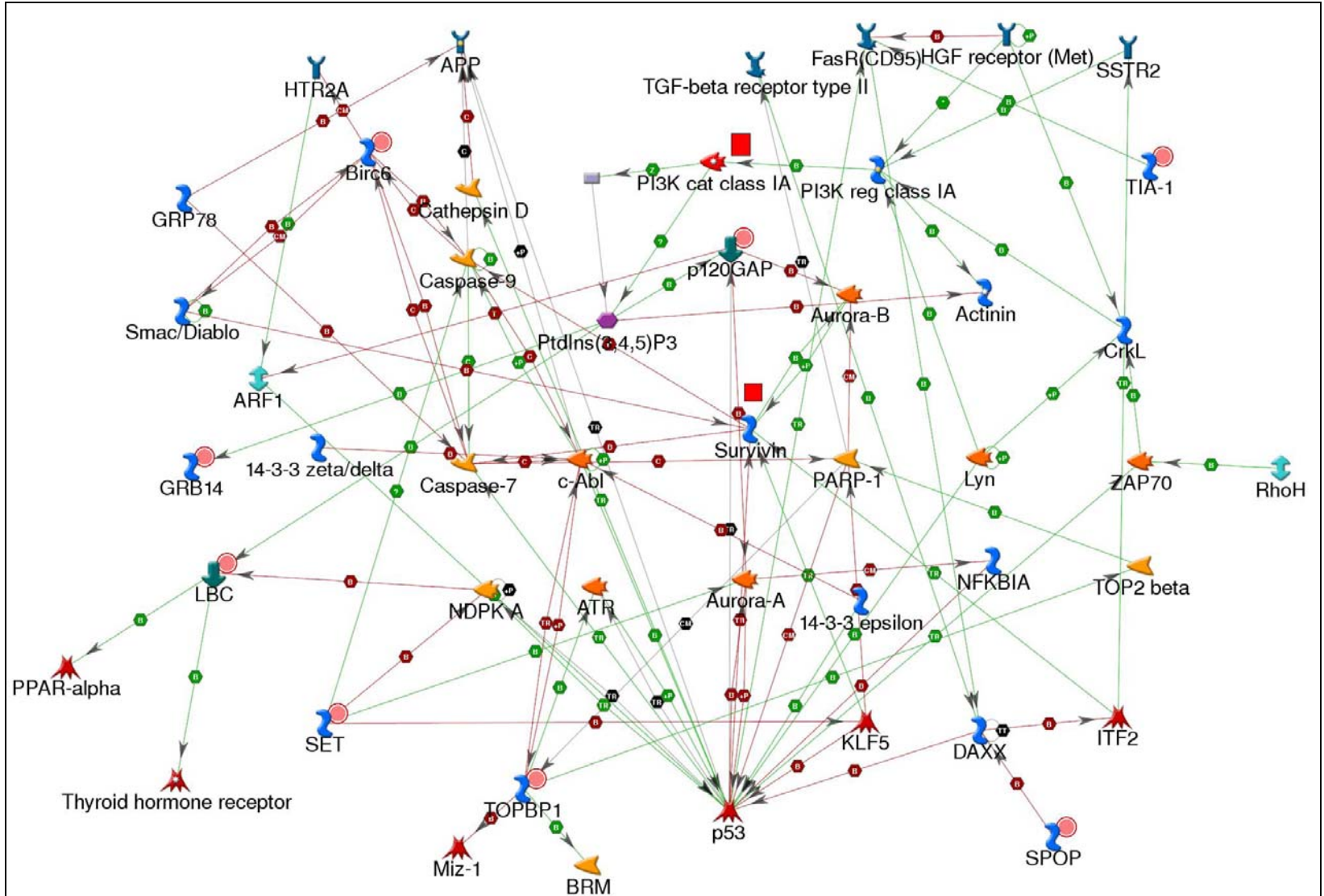
A proteína p120GAP ou RASA1 (*RAS p21 protein activator 1*) está localizada no citoplasma e é parte de uma família de regulação negativa da família Ras. A RASA1, assim como outras proteínas GAPs (*GTPase activating proteins*), forma um complexo com Ras, estimulando a conversão de Ras-GTP em Ras-GDP, com conseqüente inativação da mesma e das vias anti-apoptótica Ras/Raf(*RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*)/MEK/ERK e PI3K/AKT, como é possível observar nas figuras 31 e 32 (GREWAL; ENRICH, 2006; KAUFFMANN-ZEH et al., 1997; SUNDARAM, 2006; VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003). Nos arranjos havia cinco membros da família de sinalização do Ras e dois membros da família MEK, mas nenhum mostrou ser significativamente modulado. Assim, p120GAP, como outras proteínas GAP Ras-específicas, atuam no controle da proliferação celular e diferenciação, sugerindo que a modulação desta via é crucial ao controle da resposta biológica. A p120GAP é necessária à polarização e migração celular em fibroblastos oriundos de embriões de camundongos (KULKARNI et al., 2000). Em muitos processos de câncer, há aumento de expressão de Ras devido a sua ligação com receptores supermodulados de EGF (*epidermal growth factor*) e PDGF (*platelet derived growth factor*). Neste caso, a p120GAP é um dos potenciais candidatos à inibição da sinalização do EGFR e PDGFR, pois o domínio SH2 desta facilita sua ligação aos receptores de EGF e PDGF, contribuindo para a inativação de Ras (GREWAL; ENRICH, 2006). Portanto, dependendo da sinalização celular, p120GAP pode modular a célula para a MCP ou para a sobrevivência, e possivelmente pela sua extrema importância na cascata de sinalização do Ras, é possível observar sua presença em duas cascatas de sinalização exemplificadas neste trabalho (Figuras 31 e 32).

Nas figuras 31 e 33 vemos também a presença da proteína survivina ou BIRC5, que também faz parte da família das IAPs, assim como o BIRC6. A survivina atua como inibidora de caspases e das proteínas apoptóticas Smac/Diablo, e, além de suprimir a MCP, regula a divisão

celular. Park e colaboradores (2007), utilizando a metodologia de RNA de interferência, descobriram que a survivina é necessária ao desenvolvimento até o estágio de blastocisto em bovinos, e que sua expressão inibe a MCP em embriões na fase de pré-implantação. Na sua ausência (*knock-out*), há um aumento de expressão da caspase 3 e fragmentação nuclear durante a pré-implantação. O gene da survivina está sob regulação transcricional positiva do fator de transcrição KLF5, já discutido anteriormente. Portanto, a presença desta proteína na rede de regulação que engloba vários outros genes diferencialmente modulados nos embriões 8 células é mais um fator de validação da modulação destes genes nesta fase embrionária (Figura 31).

A proteína pró-apoptótica p53 é um fator de transcrição induzido por estresse celular, cuja função é inibir a progressão do ciclo celular para a fase S em caso de danos no DNA. Isso permite às células realizar o reparo do dano ao DNA, ou, na incapacidade de reparo, de iniciar a MCP ou senescência (FAVETTA et al., 2004). A p53 apresenta mutações em inúmeros tipos de tumores, evidenciando sua extrema importância à manutenção da homeostase celular. Pela figura 31 pode-se ver que ela está associada a inúmeras cascatas de sinalização, algumas já descritas acima. Em estudos para determinação do papel de p53 no desenvolvimento de embriões bovinos, MATWEE e colaboradores (2000) detectaram a presença de transcritos de p53 em todas as etapas do desenvolvimento pré-implantação em bovinos, mas não localizaram a proteína em nenhuma destas etapas, sugerindo MCP independente de p53 em embriões bovinos. Este resultado foi similar a Favetta e colaboradores (2007, 2004) que estudando o bloqueio do desenvolvimento embrionário não detectaram a modulação diferencial de transcritos da proteína p53.

Figura 31. Rede de regulação que envolve os genes cuja função protéica é associada à MCP. Os símbolos com um círculo rosa na porção direita superior indicam os genes diferencialmente modulados em embriões L8 identificados no arranjo. Os símbolos com um quadrado vermelho na porção direita superior indicam os genes diferencialmente modulados detectados em embriões bovinos validados em outros experimentos. A legenda das figuras pode ser encontrada no anexo B. Conforme descrito anteriormente, o embrião de baixo potencial de desenvolvimento e alto potencial de bloqueio possui vários mRNAs de genes que regulam o processo de MCP. A presença de BIRC6, dos genes envolvidos na sinalização de PI3K (FIGUEIREDO, 2005) e da Survivina (PARK et al., 2007) mais modulados nestes embriões pode ser um indicativo de uma tentativa do embrião de se proteger contra a morte celular programada.



A figura 32 permite a identificação de três genes diferencialmente modulados em embriões 8 células, a saber, SOCS1, STAT3 e a p120GAP ou RASA1, a última já discutida. O gene SOCS1 (também chamado JAB ou SSI-1) codifica um produto que regula negativamente a transdução de sinal das citocinas pela cascata JAK/STAT3. As citocinas são moléculas que regulam uma extensa gama de eventos biológicos, incluindo a diferenciação e proliferação. A interação de citocinas com alguns receptores de superfície celular e quinases citoplasmáticas Janus (Jaks), além de transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs) leva a transdução de sinais pelo citoplasma até o núcleo, resultando em alterações transcricionais (ENDO et al., 1997; STARR; HILTON, 1998; STARR et al., 1997). O produto do gene SOCS1 liga-se às Jaks, inibindo sua atividade quinase. Ou seja, SOCS1 tem um papel central no controle da intensidade e/ou duração da resposta celular a diversos estímulos extracelulares pela supressão do processo de transdução de sinal (STARR et al., 1997), sendo uma proteína de extrema importância em processos inflamatórios e de metástase (DAVEY; HEATH; STARR, 2006). A modulação negativa da proteína SOCS1 inibe a ligação desta às Jaks, ativando a fosforilação dos fatores de transcrição STAT1, STAT3 e STAT5. Estes fatores regulam positivamente a transcrição de proteínas inibidoras de MCP, como XIAP (*X linked IAP*), Bcl-X_L e Bcl-2, além de ativar a proteína c-Myc (*myelocytomatosis viral oncogene*). Esta, por sua vez, viabiliza a transcrição de várias ciclinas, CDKs e do fator de transcrição E2F (*Rb-regulated transcription factor*), levando à divisão celular. Por outro lado, c-Myc inibe a transcrição de genes que induzem parada do ciclo celular por dano ao DNA (Gadd 45 e Gadd 153 - *growth arrest and the DNA damage inducible gene 45 and 153*) e de alguns genes inibidores de CDKs (CALÓ et al., 2003; VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003).

Assim, a baixa disponibilidade da proteína SOCS1 leva à ativação da cascata anti-apoptótica e à divisão celular via sinalização JAK/STAT. Ao contrário, a alta disponibilidade de SOCS1 leva à inibição desta cascata JAK/STAT, induzindo a MCP. Outra via de indução apoptótica pelo aumento de SOCS1 é pela regulação negativa de SOCS3 via STATs. A ausência de SOCS3 permite a liberação da proteína p120GAP ou RASA1 para inativar a proteína anti-apoptótica Ras e conseqüentemente a via Ras/Raf/MEK/ERK, que leva também à inativação da proteína anti-apoptótica c-Myc via inativação da STAT3 (GREWAL; ENRICH, 2006; VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003). Portanto, SOCS1 tem papel central na indução de MCP tanto pela inibição da via de sinalização JAK/STAT quanto da via de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK. A baixa modulação de STAT3 e a ausência de modulação significativa de STAT5, além da regulação não diferencial de membros da família MEK e Ras, todos presentes no arranjo, validam a informação da regulação diferencial de SOCS1,

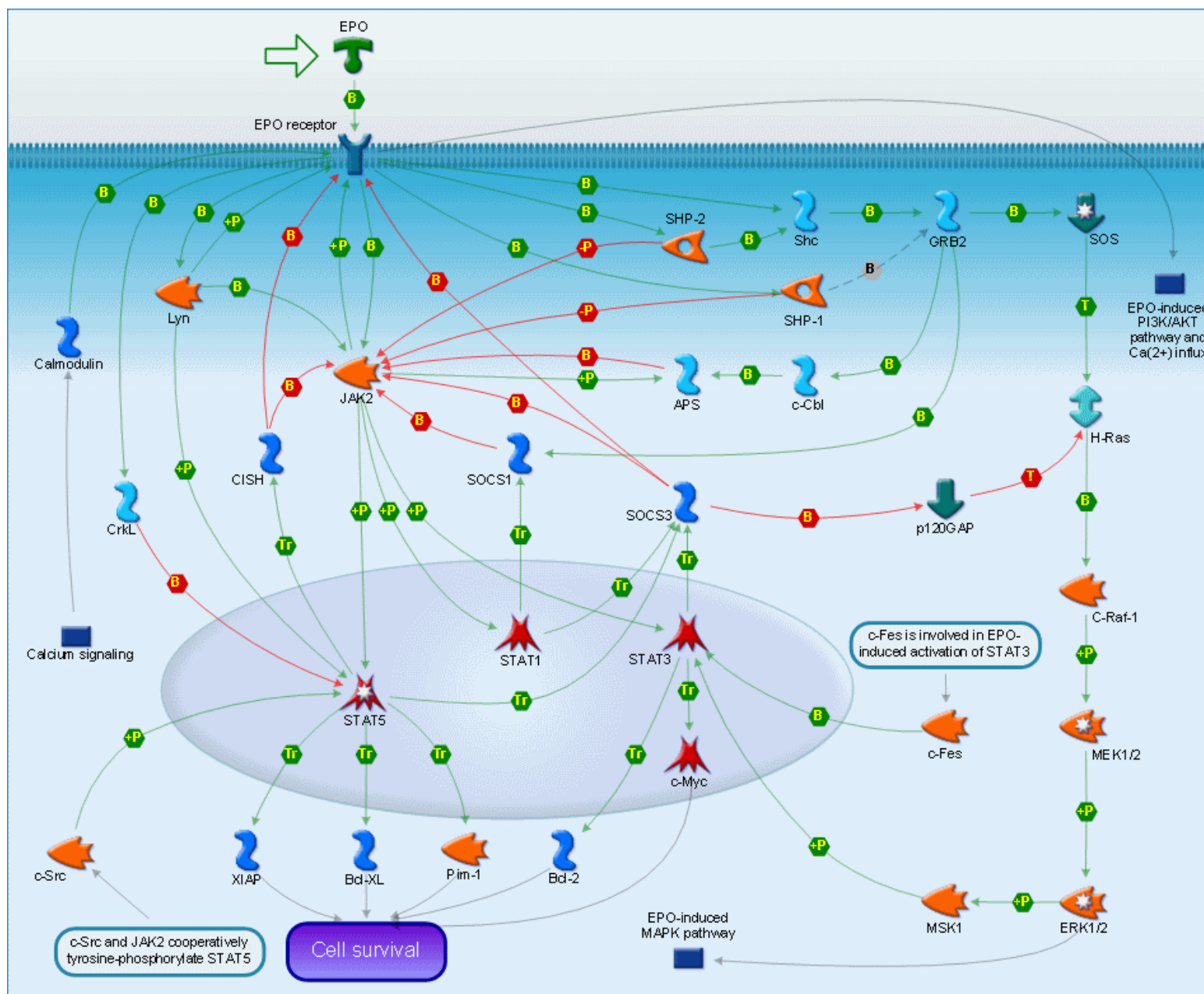
JAK/STAT e Ras/Raf/MEK/ERK, levando à MCP. Truchet e colaboradores (2004) mostraram a ocorrência da cascata JAK/STAT e um aumento de expressão de SOCS1 em oócitos e em embriões no estágio pré-implantação em camundongos.

Na figura 32 a via de sinalização PI3K/Akt está sugerida, mas não demonstrada. Entretanto, neste caso, esta pode estar agindo na fosforilação/repressão de Bad e da caspase-9, já que a PI3K é sabidamente mais expressa em embriões L8 que em embriões R8 e poderia auxiliar as vias demonstradas no mapa a resgatar estes embriões do bloqueio do desenvolvimento, levando à sobrevivência celular (FIGUEIREDO, 2005). A proteína PI3K pode estar atuando abaixo da sinalização de Ras, auxiliando na ativação das cascatas de sobrevivência celular MEK/ERK e AKT/NF- κ B (GINGERY et al., 2003; KAUFFMANN-ZEH et al., 1997).

Os membros da família Bcl-2 (*B cell leukemia/lymphoma 2*) são reguladores das alterações mitocondriais durante a MCP, e estão presentes no citoplasma ou nas mitocôndrias (Figura 32). Esta família é composta por cerca de 30 genes, divididos em anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, MCL-1, Al, Boo) e pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bok, Bik, HRK, Bnip3, Bim, Bad, Bid, Bcl-X_s, entre outros; JURISICOVA; ACTON, 2004; SKOMMER; WLODKOWIC; DEPTALA, 2007). Embora estudos demonstrassem que em oócitos e também em embriões de má qualidade a razão Bax/Bcl-2 é maior que naqueles de boa qualidade (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002), os resultados de nosso grupo de trabalho demonstraram que os transcritos de Bax e Bcl-2 estão presentes em todos os embriões, e que a razão entre eles não difere independente da sua qualidade (MEIRELLES et al., 2004), ao contrário das células do *cumulus*, onde a razão Bax/Bcl-2 foi maior naquelas células pertencentes a COCs de má qualidade (EMANUELLI, 2005), de maneira semelhante aos achados de Yang e Rajamahendran (2002) em oócitos.

Outras proteínas que compartilham o domínio BH3 também estão associadas à família Bcl-2, como a proteína ITM2B (FLEISCHER et al., 2002; SKOMMER; WLODKOWIC; DEPTALA, 2007), que é um regulador pró-apoptótico envolvido na indução do aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e conseqüente liberação do citocromo c e ativação das caspases 9 e 3. A interação de ITM2B com Bcl-2 promove a dimerização do Bax, levando à MCP, assim, a presença de ITM2B pode favorecer a atividade de Bax independente da sua razão com o Bcl-2 (FLEISCHER et al., 2002, FLEISCHER; AYLLON; REBOLLO, 2002), concordando com os achados de Meirelles e colaboradores (2004). Figueiredo (2005) demonstrou que a ITM2B é mais expressa em embriões L8, o que pode indicar que a AGE ocorre em embriões com baixo potencial de desenvolvimento visando facilitar a MCP.

Figura 32. Mapa de regulação gênica associado à sinalização para sobrevivência celular. Os símbolos com barra vermelha na porção direita superior indicam os genes diferencialmente modulados em embriões L8 identificados no arranjo. A legenda das figuras pode ser encontrada no anexo B. O sistema JAK2 – STAT3 aliado a SOCS1, que foi identificado como altamente modulado, podem sugerir um sistema de regulação da sobrevivência via p120GAP – PI3K – ERK e via c-Myc – Bcl-2.



A figura 33 permite a identificação de genes diferencialmente modulados no arranjo, além de alguns membros da família dos fatores de transcrição NF- κ B. A família dos fatores de transcrição NF- κ B consiste de 5 membros: as subunidades p50, p52, p65 (RelA), c-Rel e RelB, codificados pelos genes NFKB1, NFKB2, RELA, REL e RELB, todos com um domínio que permite a homo e a heterodimerização. A sinalização de NF- κ B consiste de uma série de reguladores positivos e negativos que regulam muitas vias de sinalização incluindo respostas inflamatórias, morte celular e sobrevivência (HAYDEN; GHOSH, 2008; LEBAN et al., 2007; NAKAJIMA et al., 2008). Os fatores de transcrição NF- κ B ficam retidos no citoplasma ligados a proteínas inibidoras de κ B (I κ B), I κ B α (NFKBIA), I κ B β (NFKBIB) ou I κ B ϵ (NFKBIE), ou aos precursores p100 (NFKB2) e p105 (NFKB1). A degradação destas proteínas I κ B permite que os membros da família NF- κ B tenham acesso ao núcleo, onde se ligam a seqüências promotoras específicas do DNA e promovem a transcrição de genes alvo. A ubiquitinação, fosforilação e degradação das I κ B dependem do complexo I κ B quinase (IKK) e das MEKK (*MAPK/ERK kinase kinase*; BONVIN et al., 2002; HAYDEN; GHOSH, 2008). Outra forma de regulação de NF- κ B é pela fosforilação de RelA, como demonstrado na figura 33 (KANE; LIN; WEISS, 2002). Alguns membros da família das MEKK e o NFKBIE, inibidor de NF- κ B, estavam no arranjo mas não sofreram modulação diferencial.

Uma das proteínas que sofre regulação transcricional por membros da via do NF- κ B é o COL1A2 (*Collagen, type I, alpha 2*). Este gene está diferencialmente regulado no arranjo, mas não existem relatos na literatura a respeito da sua presença em embriões. A transcrição dos genes colágeno tipo I é regulada por citocinas produzidas por reações inflamatórias, como por exemplo, Interleucina-4, TNF- α , interferon γ (IFN- γ) e TGF- β 1 (*transforming growth factor beta 1*; BÜTTNER; SKUPIN; RIEBER, 2004). O produto do gene TNF- α inibe a transcrição de COL1A2 via membros da família NF- κ B, que são capazes de ligar a TNF- α e mediar esta repressão. O IFN- γ também media a repressão transcricional de COL1A2. Contrariamente, o gene TGF- β 1 induz a transcrição de COL1A2 via ligação deste ao fator de transcrição AP-1 (*activator protein 1*), sendo antagonizado por TNF- α e IFN- γ (BÜTTNER; SKUPIN; RIEBER, 2004; CHUNG et al., 1996; KOUBA et al., 1999; VERRECCHIA; WAGNER; MAUVIEL, 2002).

O gene WNT10A (*Wingless-type MMTV integration site family, member 10A*), que também está diferencialmente modulado no arranjo, faz parte da via de sinalização WNT, que é um dos maiores canais de comunicação utilizados durante o desenvolvimento em células animais (HAYWARD; KALMAR; ARIAS, 2008). A proteína é responsável pela proliferação celular, migração, polaridade e diferenciação, e é altamente expressa em ovários, oócitos e

embriões pré-implantação em camundongos, apresentando uma relação com o receptor TNF- α (EISENMANN, 2005; HARWOOD et al., 2008)

O gene LBC/AKAP13 também está presente na figura 33, como parte na sinalização da via anti-apoptótica do NF- κ B (SHIBOLET et al., 2007). A proteína diferencialmente regulada HIVEP2 (*Human immunodeficiency virus type 1 enhancer-binding protein 2*) ou *MHC binding protein 2* é um fator de transcrição que interage com regiões promotoras virais e celulares, ligada à sinalização do NF- κ B, e não existem relatos da presença deste gene em embriões (SOURCE, 2000). A proteína pró-apoptótica DAXX também está presente na figura 33. DAXX promove a MCP mediada por Fas pela ativação das JNKs, mas pode estar inativada pela sua ligação com SPOP, como já demonstrado pela figura 31.

A figura 33 mostra também a proteína nuclear adaptadora DEK, que modula a estrutura cromatínica, atua na repressão transcricional e é ligante ao mRNA em eventos durante e após o seu processamento. É altamente expressa em células de mamíferos com rápida proliferação, e possivelmente, atua na via de sinalização do NF- κ B (KIM; DREYFUSS, 2001; SAMMONS et al., 2006; WALDMANN et al., 2004). A proteína DEK regula negativamente a ativação de RelA/p65 da família NF- κ B, além de inibir também a ativação de NF- κ B via TNF- α (SAMMONS et al., 2006), o que também leva a uma regulação superior de COL1A2.

É possível ver na figura 33 mostra a regulação positiva do fator de transcrição KLF5 e da subunidade p65 do NF- κ B sobre a molécula anti-apoptótica Survivina/BIRC5, levando à sobrevivência celular (GUTIÉRREZ-AGUILAR et al., 2007). Há modulação diferencial do fator de transcrição STAT4, que pertence à família das STATs, com papel no desenvolvimento de células-T e sinalização do INF- γ (CALÒ et al., 2003). O gene STAT4 é regulado positivamente por 2 citocinas, e tem sítios de ligação a NF- κ B e também ao fator de transcrição AP-1, demonstrado na figura 33. Na maturação de células dendríticas o fator de transcrição NF- κ B é necessário à expressão de STAT4 (REMOLI et al., 2007). Na porção central da figura 33 está a proteína diferencialmente modulada TIA-1, com sua regulação negativa sob o TNF- α , assim como sua regulação positiva do *splicing* alternativo de FasR (FÖRCH;VALCÁRCEL, 2001; PIECYK et al., 2000). A inibição do TNF- α via TIA-1 e DEK auxiliam na regulação positiva do gene COL1A2. Entretanto, não há relato da transcrição ou expressão de TIA-1 em estudos da fase embrionária.

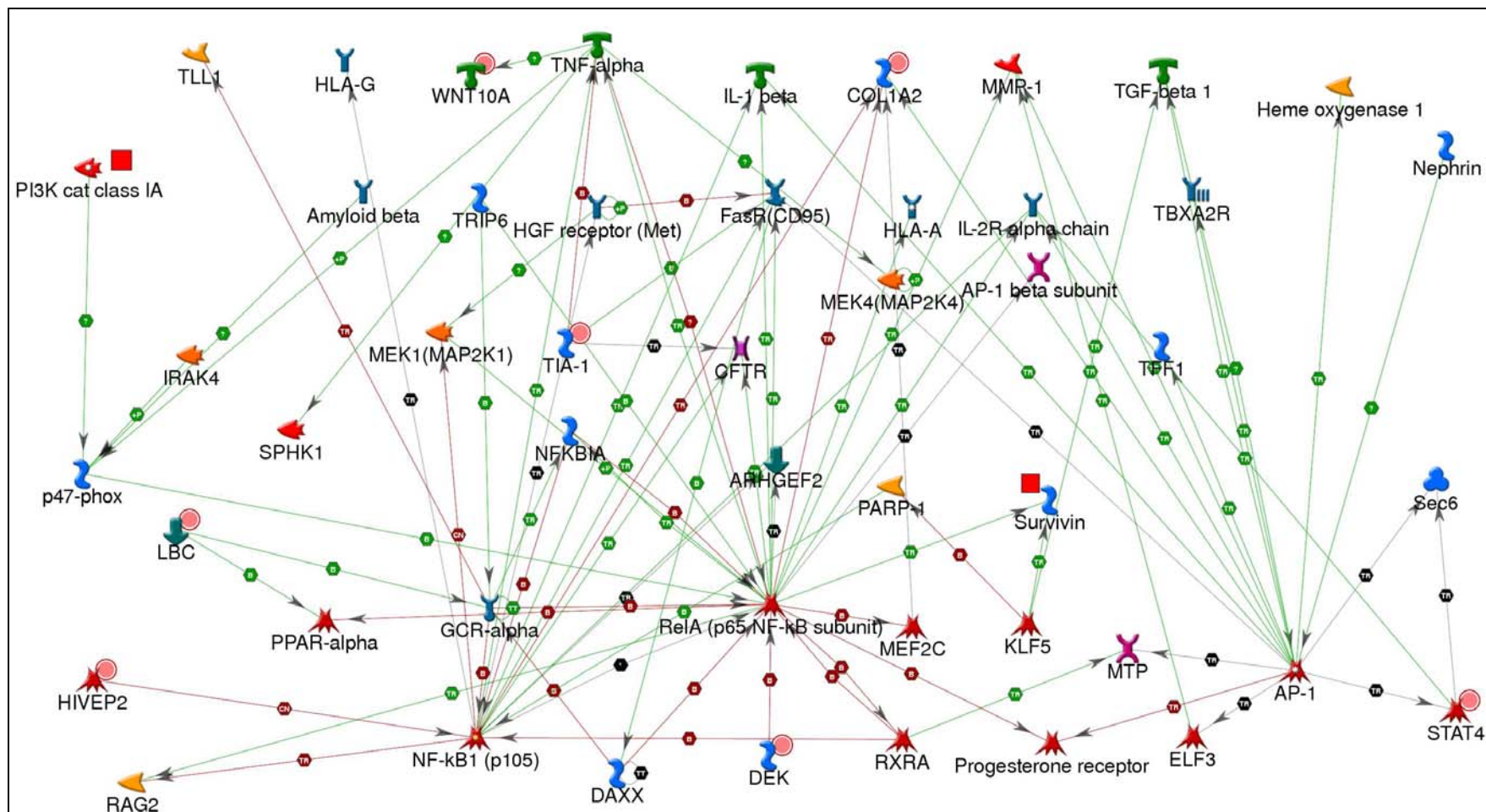
A proteína PI3K é capaz também de ativar a via Akt/NF- κ B, além da via MEK/ERK (GINGERY et al., 2003), como já descrito. Assim, a via de sinalização de NF- κ B inclui muitas proteínas representadas nesta figura, algumas com modulação diferencial neste ou em outros

estudos, como a PI3K, a COL1A2, a KLF5, a Survivina, a TIA-1, a LBC/AKAP13, a HIVEP e a DEK.

Neste trabalho foi identificado um grande número de transcritos diferencialmente modulados em embriões 8 células, especialmente no grupo de embriões com baixo potencial de desenvolvimento, corroborando vários estudos que verificaram a expressão de um grande número de genes em embriões ou oócitos com alta taxa de bloqueio quando comparados a indivíduos com baixa taxa de bloqueio (DODE et al., 2006; FAVETTA et al., 2007; 2004; FIGUEIREDO, 2005; JEONG et al., 2006; MATWEE; BETTS; KING, 2000; MEIRELLES et al., 2004). A validação da regulação de alguns destes transcritos por mapas de regulação gênica, como discutida, sugere que o bloqueio do desenvolvimento é um processo ativo, ou seja, é preciso a ocorrência da AGE, o que concorda com a hipótese proposta neste trabalho, diferindo de teorias onde embriões que sofrem bloqueio são transcricionalmente incompetentes (BETTS; KING, 2001; QIU et al., 2003; SIRARD et al., 2005; VIGNEAULT et al., 2004). Os achados que caracterizam que a ativação de caspase-3 e fragmentação nuclear, características morfológicas associadas à MCP, ocorrem de forma espontânea apenas após a AGE (FABIAN et al., 2007; GJORRET et al., 2007; GJORRET et al., 2003), corroboram que a presença de transcritos em embriões 8 células associados à sinalização para sobrevivência celular ou para MCP está relacionada ao momento da AGE. A AGE parece ocorrer em duas diferentes vias, uma que ativa a cascata de sobrevivência em embriões com alto potencial de desenvolvimento a blastocisto e outra que ativa genes ligados à MCP em embriões com baixo potencial de desenvolvimento para que ocorra a eliminação de embriões indesejáveis ou com graves defeitos genéticos (MATWEE; BETTS; KING, 2000; MEIRELLES et al., 2004).

Em oócitos e embriões foi verificada a transcrição diferencial de genes pró e anti-apoptóticos (DALBIÈS-TRAN; MERMILLOD, 2003; JURISICOVA et al., 1998; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002) e, possivelmente, a incapacidade em manter o balanço entre estes fatores poderia levar à MCP, resultando na morte de embriões durante o bloqueio do desenvolvimento embrionário (MEIRELLES et al., 2004, 2003). Entretanto, estudos mostraram que a relação Bax/Bcl-2 não difere entre embriões com alto ou baixo potencial de desenvolvimento (MEIRELLES et al., 2004; OPIELA et al., 2008). Os resultados do presente trabalho validam esta informação de não participação da via Bax/Bcl-2, identificando outras proteínas de relevância na sinalização da MCP e da sobrevivência embrionária presentes nos embriões durante a AGE. Estes achados corroboram a hipótese de que os embriões utilizam vias alternativas à via Bax/Bcl-2 na indução de MCP no momento da ativação do genoma embrionário.

Figura 33. Rede de regulação que envolve os genes cuja função protéica é associada MCP. Os símbolos com um círculo rosa na porção direita superior indicam os genes diferencialmente modulados em embriões L8 identificados no arranjo. Os símbolos com um quadrado vermelho na porção direita superior indicam os genes diferencialmente modulados detectados em embriões bovinos validados em outros experimentos. A legenda das figuras pode ser encontrada no anexo B. Conforme descrito anteriormente, o embrião de baixo potencial de desenvolvimento e alto potencial de bloqueio possui vários mRNAs de genes que regulam o processo de MCP. A presença de COL1A2, DEK, TIA-1 regulando a sinalização de sobrevivência do NF- κ B, dos genes envolvidos na sinalização de PI3K (FIGUEIREDO, 2005) e da Survivina (PARK et al., 2007) mais modulados nestes embriões pode ser um indicativo de uma tentativa do embrião de se proteger contra a morte celular programada.



7. CONCLUSÕES

- A metodologia de hibridação em membranas de *nylon* permitiu a identificação de um grande número de genes possivelmente associados às vias de sinalização de morte celular programada ou de sobrevivência celular expressos diferencialmente em embriões com baixo potencial de desenvolvimento;
- O bloqueio do desenvolvimento embrionário não é um processo passivo, mas um processo ativo que envolve a transcrição de genes para a sinalização da morte celular programada em embriões bovinos com baixa competência ao desenvolvimento;
- Os embriões bovinos com baixa competência e alta taxa de bloqueio do desenvolvimento expressam genes de diversas vias metabólicas de morte e sobrevivência, inclusive independente dos genes Bax e Bcl-2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADJAYE, J.; HERWIG R.; BRINK, T.C.; HERRMANN, D.; GREBER, B.; SUDHEER, S.; GROTH, D.; CARNWATH, J.W.; LEHRACH, H. NIEMANN, H. Conserved molecular portraits of bovine and human blastocysts as a consequence of the transition from maternal to embryonic control of gene expression. **Physiological Genomics**, Bethesda, v.31, p.315-27, 2007.
- ADJAYE, J.; HERWIG, R.; HERRMANN, D.; WRUCK, W.; BENKAHLA, A.; BRINK, T.C.; NOWAK, M.; CARNWATH, J.W.; HULTCHIG, C.; NIEMANN, H.; LEBRACH, H. Cross-species hybridization of human and bovine orthologous genes on high density cDNA microarrays. **BMC Genomics**, London v.5, p.83, 2004
- ARONOW, B.J.; RICHARDSON, B.D.; HANDWERGER, S. Microarray analysis of trophoblast differentiation: gene expression reprogramming in key gene function categories. **Physiological Genomics**, Bethesda, v.6, p.105-116, 2001.
- BACHVAROVA, R.F. A maternal tail of poly(A): the long and the short of it. **Cell**, Cambridge, v.69, p.895-97, 1992.
- BADR H.; BONGIONI, G; ABDOON, A.S.S.; KANDIL, O.; PUGLISI, R. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. **Zygote**, Cambridge, v.15, p.355-67, 2007.
- BALASUBRAMANIAN, S.; SON, W.J.; KUMAR, B.M.; OCK, S.A.; YOO, J.G.; IM, G.S.; CHOE, S.Y.; RHO, G.J. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v.68, p.265-75, 2007.
- BAUGH, L.R.; HILL, A.A.; BROWN, E.L.; HUNTER, C.P. Quantitative analysis of mRNA amplification by *in vitro* transcription. **Nucleic Acids Research**, London, v.29, n.5, p.e29, 2001.
- BETTEGOWDA, A.; LEE, K.B.; SMITH, G.W. Cytoplasmic and nuclear determinants of the maternal to embryonic transition. **Reproduction, Fertility and Development**, Victoria, v.20, p.45-53, 2008.
- BETTS, D.H.; KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, p.171-191, 2001.
- BIASE, F.H.; MERIGHE, G.F.K.; BIASE, W.K.F.S.; MARTELLI, L.; MEIRELLES, F.V. Global poly(A) mRNA expression profile measured in individual bovine oocytes and cleavage embryos. **Zygote**, Cambridge, v.16, p.29-38, 2008.

BILODEAU-GOESEELS, S.; SCHULTZ, G.A. Changes in ribosomal ribonucleic acid content within *in vitro*-produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, New York, v.56, p.1323-29, 1997.

BONVIN, C.; GUILLON, A.; van BEMMELEN, M.X.; GERWINS, P.; JOHNSON, G.L.; WIDMANN, C. Role of amino-terminal domain of MEKKs in the activation of NF κ B and MAPK pathways and in the regulation of cell proliferation and apoptosis. **Cellular Signaling**, New York, v.14, p.123-31, 2002.

BRATTON, S.B.; MacFARLANE, M.; CAIN, K.; COHEN, G.M. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. **Experimental Cell Research**, New York, v.256, p.27-33, 2000.

BREVINI, T.A.; LONERGAN, P.; CILLO, F.; FRANCISCI, C.; FAVETTA, L.A.; FAIR, T.; GANDOLFI, F. Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.63, n.4, p.510-7, 2002.

BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v.29, p.23-39, 2002.

BÜTTNER, C.; SKUPIN, A.; RIEBER, E.P. Transcriptional activation of the type I collagen genes COL1A1 and COL1A2 in fibroblasts by Interleukin-4: analysis of the functional collagen promoter sequences. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v.198, p.248-58, 2004.

CALÒ, V.; MIGLIAVACCA, M.; BAZAN, V.; MACALUSO, M.; BUSCEMI, M.; GEBBIA, N.; RUSSO, A. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v.197, p.157-68, 2003.

CAUSTON, H.C.; QUACKENBUSH, J.; BRAZMA, A. **Microarray Gene Expression Data Analysis. A Beginner's Guide**. Blackell Publishing, 2003.

CERVONI, L.; EGISTELLI, L.; EUFEMI, M.; ABUSCO, A.S.; ALTIERI, F.; LASCU, I.; TURANO, C.; GIARTOSIO, A. DNA sequences acting as binding sites for NM23/NDPK proteins in melanoma M14 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v.98, p.421-28, 2006.

CHARPIN, C.; BOUVIER, C.; GARCIA, S.; MARTINI, F.; ANDRAC, L.; LAVAUT, M.N.; ALLASIA, C. Automated and quantitative immunocytochemical assays of Nm23/NDPK protein in breast carcinomas. **International Journal of Cancer**, New York, v.74, p.416-20, 1997.

CHEN, H.W.; CHEN, J.J.W.; YU, S.L.; LI, H.N.; YANG, P.C.; SU, C.M.; AU, H.K.; CHANG, C.W.; CHIEN, L.W.; CHEN, C.S.; TZENG, C.R. Transcriptome analysis in blastocyst hatching by cDNA microarray. **Human Reproduction**, Oxford, v.20, p. 2492–2501, 2005

CHEN, L.Y.; ZURAW, B.K.; YE, R.D.; PAN, Z.K. A Rho exchange factor mediates fMet-Leu-Phe-induced NF- κ B activation in human peripheral blood monocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.279, p.7208-12, 2004.

CHOWDHURY, I.; THARAKAN, B.; BHAT, G.K. Current Concepts In Apoptosis: The Physiological Suicide Program Revisited. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 11, p.506-25, 2006.

CHUNG, K.Y.; AGARWAL, A.; UITTO, J.; MAUVIEL, A. An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human α 2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor- β . **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.271, p.3272-78, 1996.

COENEN, K.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.A. Study of newly synthesized proteins during bovine oocyte maturation *in vitro* using analysis of two-dimensional gel electrophoresis. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.67, p.313-22, 2004.

CRADDOCK, B.L.; ORCHISTON, E.A.; HINTON, H.J.; WELHAM, M.J. Dissociation of apoptosis from proliferation, protein kinase B activation, and BAD phosphorylation in interleukin-3-mediated phosphoinositide 3-kinase signaling. **J Biol Chem**, Bethesda, v.274, p.10633-40, 1999.

CUI X.S.; KIM, N.H. Maternally derived transcripts: identification and characterisation during oocyte maturation and early cleavage. **Reproduction, Fertility and Development**, Victoria, v.19, p.25-34, 2007.

DALBIÈS-TRAN, R.; MERMILLOD, P. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.68, p.252-61, 2003.

DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S.J. Cell death: Critical control points. **Cell**, Cambridge, v.116, p.205-19, 2004.

DAVEY, G.M.; HEATH, W.R.; STARR, R. SOCS1: a potent and multifaceted regulator of cytokines and cell-mediated inflammation. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.67, p.1-9, 2006.

DE SOUSA, P.A.; WESTHUSIN, M.E.; WATSON, A.J. Analysis of variation in relative mRNA abundance for specific gene transcripts in single bovine oocytes and early embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.49, p.119-30, 1998.

DE SOUSA, P.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, R.M. Transient expression of a translation initiation factor is conservatively associated with embryonic gene activation in murine and bovine embryos. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.59, p.969-77, 1998.

DE SOUSA, P.A.; CAVENEY, A.; WESTHUSIN, M.E.; WATSON, A.J. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. **Theriogenology**, Los Altos, v. 49, p.115-28, 1998.

DODE, M.A.N.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.A. Quantitative Expression of Candidate Genes for Developmental Competence in Bovine Two-Cell Embryos. **Molecular Reproduction And Development**, New York, v.73, p.288–297, 2006.

DONNISON, M.; PFEFFER, P.L. Isolation of genes associated with developmentally competent oocytes and quantitation of their levels during development. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.71, p.1813-21, 2004.

DURANTHON, V.; WATSON, A.J.; LONERGAN, P. Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. **Reproduction**, Cambridge, v.135, p.141-150, 2008.

EBERWINE, J. Amplification of mRNA populations using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA. **Biotechniques**, Natick, v.20, p.584-91, 1996.

EISENMANN, D.M. Wnt signaling. **Wormbook**, disponível em <www.wormbook.org>, v.25, p.1-17, 2005.

ELLESTAD L.E.; CARRE, W.; MUCHOW, M.; JENKINS, S.A.; WANG, X.; COGBURN, L.A.; PORTER, T.E. Gene expression profiling during cellular differentiation in the embryonic pituitary gland using cDNA microarrays. **Physiological Genomics**, Bethesda, v.25, p.229-37, 2006.

EMANUELLI, I.P. Interação cumulus e oócito no processo de morte celular programada durante a produção de embriões bovinos in vitro. 2005.93 f. **Dissertação (Mestrado)**, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

ENDO, T.A.; MASUHARA, M.; YOKOUCHI, M.; SUZUKI, R.; SAKAMOTO, H.; MITSUI, K.; MATSUMOTO, A.; TANIMURA, S.; OHTSUBO, M.; MISAWA, H.; MIYAZAKI, T.; LEONOR, N.;

TANIGUCHI, T.; FUJITA, T.; KANAKURA, Y.; KOMIYA, S.; YOSHIMURA, A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. **Nature**, London, v.387, p.921-24, 1997.

FABIAN, D.; MAKAREVICH, A.V.; CHRENEK, P.; BUKOVSKÁ, A.; KOPPEL, J. Chronological appearance of spontaneous and induced apoptosis during preimplantation development of rabbit and mouse embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v.68, p.1271-81, 2007.

FAIR, T.; CARTER, F.; PARK, S.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. **Theriogenology**, Los Altos, v.68, S.91-7, 2007.

FAVETTA, L.A.; MADAN, P.; MASTROMONACO, G.F.; JOHN, E.J.ST.; KING, W.A. The oxidative stress adaptor p66shc is required for permanent embryo arrest in vitro. **BMC Developmental Biology**, London, v.7, p.132, 2007.

FAVETTA, L.A.; ROBERT, C.; JOHN, E.J.ST.; BETTS, D.H.; KING, W.A. p66^{shc}, but not p53, is involved in early arrest of in vitro produced bovine embryos. **Molecular Human Reproduction**, v.10, p.383-92, 2004.

FIGUEIREDO, P.R. Genômica funcional da ativação do genoma e bloqueio embrionário em bovinos. 2005. 103 f. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

FISSORE, R.A.; HE, C.L.; WOUDE, G.F.V. Potential role of Mitogen-Activated Protein Kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 55, p.1261-70, 1996.

FLEISCHER, A.; AYLLON, V.; DUMOUTIER, L.; RENAULT, J.C.; REBOLLO, A. Proapoptotic activity of ITM2Bs, a BH3-only protein induced upon IL-2 deprivation which interacts with Bcl-2. **Oncogene**, Basingstoke, v.21, p.3181-89, 2002.

FLEISCHER, A.; AYLLON, V.; REBOLLO, A. ITM2Bs regulate apoptosis by inducing loss of mitochondrial membrane potential. **Eur J Immun**, Weinheim, v.32, p.3498-3505, 2002.

FÖRCH, P.; VALCÁRCEL, J. Molecular mechanisms of gene expression regulation by the apoptosis-promoting protein TIA-1. **Apoptosis**, New York, v.6, p.463-68, 2001.

FRIEDRICH, J.K.; PANOV, K.I.; CABART, P.; RUSSELL, J.; ZOMERDIJK, J.C.B.M. TBP-TAF complex SL1 directs RNA polymerase I pre-initiation complex formation and stabilizes upstream binding factor at the rDNA promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.290, p.29551-58, 2005.

GANDOLFI, T.A.L.B; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, p.1255-76, 2001.

GARCIA, S.M. Bloqueio e morte celular programada em embriões bovinos: efeitos da fonte de suplementação protéica e da cinética do desenvolvimento. 2004. 80 f. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

GINGERY, A.; BRADLEY, E.; SHAW, A.; OURSLER, M.J. Phosphatidylinositol 3-kinase coordinately activates the MEK/ERK and AKT/NF κ B pathways to maintain osteoclast survival. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v.89, p.165-79, 2003.

GINSBERG, S.D. RNA amplification strategies for small sample populations. **Methods**, Amsterdam, v.37, p.229–237, 2005.

GJORRET, J.O.; FABIAN, D.; AVERY, B.; MADDOX-HYTTEL, P. Active caspase-3 and ultrastructural evidence in spontaneous and induced cell death in bovine in vitro produced pre-implantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.74, p.961-71, 2007.

GJORRET, J.O.; KNIJN, H.M.; DIELEMAN, S.J.; AVERY, B.; LARSSON, L.I.; MADDOX-HYTTEL, P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.69, p.1193-200, 2003.

GOMES, I.H.; SILVA, R.L.A.; STOLF, B.S.; CRISTO, E.B.; HIRATA JR, R.; SOARES, F.A.; REIS, L.F.L.; NEVES, E.J.; CARVALHO, A.F. Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. **Analytical Biochemistry**, New York, v.321, p.244-251, 2003.

GOOSSENS, K.; SOOM, A.V.; POUCKE, M.V.; VANDAELE, L.; VANDESOMPELE, J.; ZEVEREN, A.V.; PEELMAN, L.J. Identification and expression analysis of genes associated with bovine blastocyst formation. **BMC Developmental Biology**, London, v.7, p.64, 2007.

GOOSSENS, K.; VAN POUCKE, M.; VAN SOOM, A.; VANDDESOMPELE, J.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L.J. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. **BMC Developmental Biology**, London, v.5, p.27-35, 2005.

GREEN, D.R. Apoptotic Pathways: ten minutes to dead. **Cell**, Cambridge, v.121, p.671-74, 2005.

GREEN, D.R.; EVAN, G.I. A matter of life and death. **Cancer Cell**, Cambridge, v.1, n.1, p.19-30, 2002.

GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and Apoptosis. Review. **Science**, Stanford, v. 281, n.5381, p.1309-12, 1998.

GREWAL, T.; ENRICH, C. Molecular mechanisms involved in Ras inactivation: the annexin A6-p120GAP complex. **BioEssays**, Cambridge, v.28, p.1211-20, 2006.

GUIMARÃES, C.A.; LINDEN, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.271, p.1638-50, 2004.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **International Journal of Oncology**, Philadelphia, v.22, p.15-20, 2003.

GUTIÉRREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T.; MOREIRA, P.N.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.68, p.441-448, 2004.

GUTIÉRREZ-AGUILAR, R.; BENMEZROUA, Y.; VAILLANT, E.; BALKAU, B.; MARRE, M.; CHARPENTIER, G.; SLADEK, R.; FROGUEL, P.; NEVE, B. Analysis of KLF transcription factor family gene variants in type 2 diabetes. **BMC Medical Genetics**, London, v.8, p.53-57, 2007.

HAJRA, K.M.; LIU, J.R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, New York, v.9, p.691-704, 2004.

HAO, Y.; SEKINE, K.; KABAWATA, A.; NAKAMURA, H.; ISHIOKA, T.; OHATA, H.; KATAYAMA, R.; HASSHIMOTO, C.; ZHANG, X.; NODA, T.; TSURUO, T.; NAITO, M. Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. **Nature Cell Biology**, London, v.6, p.849-60, 2004.

HARRINGTON, C.A.; ROSENOW, C.; RETIEF, J. Monitoring gene expression using DNA microarrays. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.3, n.3, p.285-91, 2000.

HARWOOD, B.N.; CROSS, S.K.; RADFORD, E.E.; HAAC, B.E.; DE VRIES, W.N. Members of the WNT signaling pathways are widely expressed in mouse ovaries, oocytes and cleavage stage embryos. **Developmental Dynamics**, New York, v.237, p.1099-11, 2008.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Shared principles in NF- κ B signaling. **Cell**, Cambridge, v.132, p.344-62, 2008.

HAYWARD, P.; KALMAR, T.; ARIAS, A.M. Wnt/Notch signaling and information processing during development. **Development**, Washington, v.135, p.411-24, 2008.

HEMMING, R.; AGATEP, R.; BADIANI, K.; WYANT, K.; ARTHUR, G.; GIETZ, R.D.; TRIGGS-RAINE, B. Human growth factor receptor bound 14 binds the activated insulin receptor and alters the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation levels of multiple proteins. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v.79, p.21-32, 2001

HYTTEL, P.; VIUFF, D.; FAIR, T.; LAURINCIK, J.; THOMSEN, P.D.; CALLESEN, H.; VOS, P.L.A.M.; HENDRIKSEN, P.J.M.; DIELEMAN, S.J.; KARL SCHELLANDER, K.; BESENFELDER, U.; GREVE, T. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, Cambridge, v.122, p.21-30, 2001.

HOLT, L.J.; SIDDLE, K. Grb10 and Grb14: enigmatic regulator of insulin action-and more?. **Biochemical Journal**, London, v.388, p.393-406, 2005.

JACOBSON, M.D.; WEIL, M.; RAFF, M.C. Programmed Cell Death in Animal Development. Review. **Cell**, Cambridge, v. 88, p.347-354, 1997.

JENSON, S.D.; ROBETORYE, R.S.; BOHLING, S.D.; SCHUMACHER, J.A.; MORGAN, J.W.; LIM, M.S.; ELENITOBA-JOHNSON, K.S.J. Validation of cDNA microarray gene expression data obtained from linearly amplified RNA. **Molecular Pathology**, London, v.56, p.307-312, 2003.

JEONG, H.J.; KIM, H.J.; LEE, S.H.; KWACK, K.; AHN, S.Y.; CHOI, Y.J.; KIM, H.G.; LEE, K.W.; LEE, C.N.; CHA, K.Y. Gene expression profiling of the pre-implantation mouse embryo by microarray analysis: Comparison of the two-cell stage and two-cell block. **Theriogenology**, Los Altos, v.66, p.785-796, 2006.

JEONG, Y.J.; CHOI, H.W.; SHIN, H.S.; CUI, X.S.; KIM, N.H.; GERTON, G.L.; JUN, J.H. Optimization of Real Time RT-PCR Methods for the Analysis of Gene Expression in Mouse Eggs and Preimplantation Embryos. **Molecular Reproduction And Development**, New York, v.71, p.284-289, 2005.

JONES, G.M.; CRAM, D.S.; SONG, B.; MAGLI, M.C.; GIANAROLI, L.; LACHAM-KAPLAN, O.; FINDLAY, J.K.; JENKIN, G.; TROUNSON, A.O. Gene expression profiling of human oocytes following in vivo or in vitro maturation. **Human Reproduction**, Oxford, v.23, p.1138-44, 2008.

JOZA, N.; SUSIN, S.A.; DAUGAS, E.; STANFORD, W.L.; CHO, S.K.; LI, C.Y.J.; SASAKI, T.; ELIA, A.J.; CHENG, H.Y.M.; RAVAGNAN, L.; FERRI, K.F.; ZAMZAMI, N.; WAKEHAM, A.; HAKEM, R.; YOSHIDA, H.; KONG, Y.Y.; MAK, T.W.; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J.C.; KROEMER, G.; PENNINGER, J.M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, London, v. 410, p. 549-54, 2001.

JURISICOVA, A.; ACTON, B.M. Deadly decisions; the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. **Reproduction**, Cambridge, v.128, p.281-91, 2004.

JURISICOVA, A.; LATHAM, K.E.; CASPER, R.F.; VARMUZA, S.L. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.51, p.243-53, 1998.

KANE, L.P.; LIN, J.; WEISS, A. It's all Rel-ative: NF- κ B and CD28 costimulation of T-cell activation. **Trends in Immunology**, Oxford, v.23, p.413-20, 2002.

KANKA, J. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. **Theriogenology**, Los Altos, v.59, p.3-19, 2003.

KATO, Y.; LI, X.; AMARNATH, D.; USHIZAWA, K.; HASHIZUME, K.; TOKUNAGA, T.; TANIGUCHI, M.; TSUNODA, Y. Comparative gene expression analysis of bovine nuclear-transferred embryos with different developmental potential by cDNA microarray and Real-time PCR to determine genes that might reflect calf normality. **Cloning and Stem Cells**, New Rochelle, v.9, p.495-511, 2007.

KAUFFMANN-ZEH, A.; RODRIGUEZ-VICIANA, P.; ULRICH, E.; GILBERT, C.; COFFER, P.; DOWNWARD, J.; EVAN, G. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signaling through PI(3)K and PKB. **Nature**, London, v.385, p.544-48, 1997.

KIM, M.R.; TILLY, J.L. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. **Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research**, Amsterdam, v.1644, p.205-10, 2004.

KIM, N.G.; RHEE, H.; LI, L.S.; KIM, H.; LEE, J.S.; KIM, J.H.; KIM, N.K.; KIM, H. Identification of MARCKS, FLJ1183 and TAF1B as putative novel target genes in colorectal carcinomas with microsatellite instability. **Oncogene**, Basingstoke, v.21, p.5081-87, 2002.

KIM, V.N.; DREYFUSS, G. Nuclear mRNA binding proteins couple pre-mRNA splicing and post-splicing events. **Molecules and Cells**, v.12, p.1-10, 2001.

KOUBA, D.J.; CHUNG, K.Y.; NISHIYAMA, T.; VINDEVOGHEL, L.; KON, A.; KLEMENT, J.F.; UITTO, J.; MAUVIEL, A. Nuclear factor- κ B mediates TNF- α inhibitory effect on α 2(I) collagen (COL1A2) gene transcription in human dermal fibroblasts. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v.162, p.4226-34, 1999.

KUIVANIEMI, H.; TROMP, G.; PROCKOP, D.J. Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.5, p.2052-60, 1991.

KULKARNI, S.V.; GISH, G.; VAN DER GEER, P.; HENKEMEYER, M.; PAWSON, T. Role of p120Ras-GAP in directed cell movement. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.149, p.457-70.

KUMAGAI, A.; LEE, J.; YOO, H.Y.; DUNPHY, W.G. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. **Cell**, Cambridge, v.124, p.943-55, 2006.

KUNKEL, E.J.; BUTCHER, E.C. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. **Immunity**, Cambridge, v.16, p.1-4, 2002.

KWAK, J.H.; KIM, S.I.; KIM, J.K.; CHOI, M.E. BAT3 interacts with transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors and enhances TGF-beta1-induced type I collagen expression in mesangial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.283, p.19816-25, 2008.

KWONS, K.E.; LA, M.; OH, K.H.; OH, Y.M.; KIM, G.R.; SEOL, J.H.; BAEK, S.H.; CHIBA, T.; TANAKA, K.; BANG, O.S.; JOE, C.O.; CHUNG, C.H. BTB domain-containing speckle-type POZ protein (SPOP) serves as an adaptor of Daxx for ubiquitination by Cul3- based ubiquitin ligase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.281, p.12664-72, 2006.

LA, M.; KIM, K.; PARK, J.; WON, J.; LEE, J.H.; FU, Y.M.; MEADOWS, G.G.; JOE, C.O. Daxx-mediated transcriptional repression of MMP1 gene is reversed by SPOP. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.320, p.760-65, 2004.

LANGLAIS, P.; DONG, L.Q.; RAMOS, F.J.; DERONG, H.; YUNHUA, L.; QUO9N, M.J.; LIU, F. Negative regulation of insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase signaling by Grb10. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v.18, p.350-58, 2004.

LATHAM, K.E.; SCHULTZ, R.M. Embryonic genome activation. Review. **Frontiers in Bioscience**, Albertson, v.6, p.D748-59, 2001.

LEBAN, J.; BAIERL, M.; MIES, J.; TRENTINAGLIA, V.; RATH, S.; KRONTHALER, K.; WOLF, K.; GOTSCHILICH, A.; SEIFERT, M.H.J. A novel class of potent NF- κ B signaling inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.17, p.5858-62, 2007.

LEE, J.; KUMAGAI, A.; DUNPHY, W.G. The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.282, p.28036-44, 2007.

LEQUARRE, A.S.; TRAVERSO, J.M.; MARCHANDISE, J.; DONNAY, I. Poly(A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. **Biology of Reproduction**, New York, v.71, p.425-31, 2004.

LEVAV-COHEN, Y.; GOLDBERG, Z.; ZUCKERMAN, V.; GROSSMAN, T.; HAUPT, S.; HAUPT, Y. c-Abl as a modulator of p53. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.331, p.737-49, 2005.

LI, X.Y.; CUI, X.S.; KIM, N.H. Transcription profile during maternal to zygotic transition in the mouse embryo. **Reproduction, Fertility and Development**, Victoria, v.18, p.635-645, 2006.

LI, Y.; LI, T.; LIU, S.; QIU, M.; HAN, Z.; JIANG, Z.; LI, R.; YING, K.; XIE, Y.; MAO, Y. Systematic comparison of the fidelity of aRNA, mRNA and T-RNA on gene expression profiling using cDNA microarray. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.107, p.19-28, 2004.

LIU, L.; YANG, X. Interplay of Maturation-Promoting Factor and Mitogen-Activated Protein Kinase inactivation during Metaphase-to-Interphase transition of activated bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.61, p.1-7, 1999.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, Oxford, v.38, p.259-67, 2003.

LOTZ, K.; PYROWOLAKIS, G.; JENTSCH, S. BRUCE, a giant E2/E3 ubiquitin ligase and inhibitor of apoptosis protein of the *trans*-Golgi network, is required for normal placenta development and mouse survival. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.24, p.9339-50, 2004.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, Los Altos, v.61, p.329-35, 2004.

MAMO, S.; SARGENT, C.A.; AFFARA, N.A.; TESFAYE, D.; EL-HALAWANY, N.; WIMMERS, K.; GILLES, M.; SCHELLANDER, K.; PONSUKSILI, S. Transcript Profiles of Some Developmentally Important Genes Detected in Bovine Oocytes and In Vitro-produced Blastocysts Using RNA Amplification and cDNA Microarrays. **Reproduction in Domestic Animals**, Oxford, v.41, p.527–534, 2006.

MAMO, S.; BODO, S.; KOBOLAK, J.; POLGAR, Z.; TOLGYESI, G.; DINNYES, A. Gene expression profiles of vitrified in vivo derived 8-cell stage mouse embryos detected by high density oligonucleotide microarrays. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.73, p.1380-1392, 2006.

MANSER, J.; WOOD, W.B. Mutations affecting embryonic cell migrations in *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Genetics**, New York, v.11, p.49-64, 1990.

MARTIN, S.J. An Apollon vista of death and destruction. **Nature Cell Biology**, London, v.6, p.804-06, 2004.

MASSICOTTE, L.; COENEN, K.; MOUROT, M.; SIRARD, M.A. Maternal housekeeping proteins translated during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Proteomics**, Weinheim, v.6, p.3811–3820, 2006.

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

McALINDEN, A.; LIANG, L.; MUKUDAI, Y.; IMAMURA, T.; SANDELL, L.J. Nuclear protein TIA-1 regulates COL2A1 alternative splicing and interacts with precursor mRNA and genomic DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.282, p.24444-54, 2007.

MEI, F.C.; YOUNG, T.W.; LIU, J.; CHENG, X. RAS-mediated epigenetic inactivation of OPCML in oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.20, p.497-9, 2006.

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

MEIRELLES, F.V.; MERIGHE, G.K.; SCHWARZ, K.L.; GARCIA, S.M.; EMANUELLI, I.P.; FIGUEIREDO, P.R.; PUELKER, R.Z.; CARAMBULA, S.F.; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F. Cytoplasm genetics and epigenetics during embryo development. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.31 (Suplemento), p.57-63, 2003.

MEMILI, E.; FIRST, N.L. Zygotic and embryonic expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, Cambridge, v.8, p.87-96, 2000.

MEMILI, E.; FIRST, N.L. Developmental changes in RNA polymerase II in bovine oocytes, early embryos, and effect of alpha-amanitin on embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.51, p.381-89, 1998.

MEMILI, E.; DOMINKO, T.; FIRST, N.L. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.51, p. 36-41, 1998.

METCALF, A.D.; BLOOR, D.J.; LIEBERMAN, B.A.; KIMBER, S.J.; BRISON, D.R. Amplification of representative cDNA pools from single human oocytes and pronucleate embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.65, p.1-8, 2003.

MISIRLIOGLU, M.; PAGE, G.P.; SAGIRKAYA, H.; KAYA, A.; PARRISH, J.J.; FIRST, N.L.; MEMILI, E. Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.103, p. 18905-10, 2006.

MOHAN, M.; RYDER, S.; CLAYPOOL, P.L.; GEISERT, R.D.; MALAYER, J.R. Analysis of gene expression in the bovine blastocyst produced *in vitro* using suppression-subtractive hybridization. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.67, p.447-53, 2002.

MOLL, P.R.; DUSCHL, J.; RICHTER, K. Optimized RNA amplification using T7-RNA-polymerase based *in vitro* transcription. **Analytical Biochemistry**, New York, v.334, p.164-74, 2004.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M.A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.73, p.1367-79, 2006.

MURCHINSON, E.P.; STEIN, P.; XUAN, Z.; PAN, H.; ZHANG, M.Q. SCHULTZ, R.M.; HANNON, G.J. Critical roles for Dicer in the female germLine. **Genes & Development**, New York, v.21, p.682-93, 2007.

NAGATA, S. Apoptosis by death factor. Review. **Cell**, Cambridge, v.88, p.355-65, 1997.

NAKAJIMA, H.; FUJIWARA, H.; FURUICHI, Y.; TANAKA, K.; SHIMBARA, N. A novel small-molecule inhibitor of NF- κ B signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.368, p.1007-13, 2008.

NIEMANN, H.; CARNWATH, J.W.; KUES, W. Application of DNA array technology to mammalian embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v.68S, p.S165-S177, 2007.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, Los Altos, v.53, p.21-34, 2000.

OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; LIPINSKI, D.; SLOMSKI, R.; BZOWSKA, M.; RYNSKA, B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.69, p.546-555, 2008.

PARK, S.Y.; KIM, E.Y.; JEON, K. CUI, X.S., LEE, W.D.; KIM, N.H.; PARK, S.P.; LIM, J.H. Survivina acts as anti-apoptotic factor during the development of bovine pre-implantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.74, p.582-90, 2007.

PARK, J.Y.; KIM, S.Y.; LEE, J.H.; SONG, J.; NOH, J.H.; LEE, S.H.; PARK, W.S.; YOO, N.J.; LEE, J.Y.; NAM, S.W. Application of amplified RNA and evaluation of cRNA targets for spotted-oligonucleotide microarray. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.325, p.1346–1352, 2004.

PASSOS, G.A.S.; NGUYEN, C.; JORDAN, B. Projeto transcriptoma: análise da expressão gênica em larga escala usando DNA-arrays. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, v.12, p.34-37, 2000.

PATEL, O.V.; SUCHYTA, S.P.; SIPKOVSKY, S.S.; YAO, J.; IRELAND, J.J.; COUSSENS, P.M.; SMITH, G.W. Validation and application of a high fidelity mRNA linear amplification procedure for profiling gene expression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.105, p.31–342, 2005.

PENALOZA, C.; LIN, L.; LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z. Cell death in development: shaping the embryo. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v.126, p.149–158, 2006.

PHILLIPS, J.; EBERWINE, J.H. Antisense RNA amplification: a linear amplification method for analyzing the mRNA population from single living cells. **Methods**, Amsterdam, v.10, p.283-88, 1996.

PIECYK, M.; WAX, S.; BECK, A.R.P.; KEDERSHA, N.; GUPTA, M.; MARITIM, B.; CHEN, S.; GUEYDAN, C.; KRUYIS, V.; STREULI, M.; ANDERSON, P. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- α . **The EMBO Journal**, Oxford, v.19, p.4154-63, 2000.

PIKÓ, L.; CLEGG, K.B. Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos. **Developmental Biology**, New York, v.89, p.362-78, 1982.

QIU, X.B.; GOLDBERG, A.L. The membrane associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and Caspase-9. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.280, p.174-82, 2005.

QIU, J.J.; ZHANG, W.W.; WU, Z.L.; WANG, Y.H.; QIAN, M.; LI, Y.P. Delay of ZGA initiation occurred in 2-cell blocked mouse embryos. **Cell Research**, Beijing, v.13, p.179-185, 2003.

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

REED, J.E.; DUNN, J.R.; du PLESSIS, D.G.; SHAW, E.J.; GEE, A.L.; WARNKE, P.C.; SELLAR, G.C.; MOSS, D.J.; WALKER, C. Expression of cellular adhesion molecules OPCML is down-regulated in gliomas and other brain tumours. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, Oxford, v.33, p.77-85, 2007.

REMOLI, M.E.; RAGIMBEAU, J.; GIACOMINI, E.; GAFA, V.; SEVERA, M.; LANDE, R.; PELLEGRINI, S.; COCCIA, E.M. NF- κ B is required for STAT-4 expression during dendritic cell maturation. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v.81, p.355-63, 2007.

REN, J.; SHI, M.; LIU, R.; YANG, Q.H.; JOHNSON, T.; SKARNES, W.C.; DU, C. The Birc6 (Bruce) gene regulates p53 and the mitochondrial pathway of apoptosis and is essential for mouse embryonic development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.102, p.565-70, 2005.

RIZOS, D.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P. Effect of duration of oocyte maturation on the kinetics of cleavage, embryo yield and sex ratio in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, Victoria, v.20, p.734-740, 2008.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; ARROYO-GARCÍA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Analysis of differential Messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.66, p.589-95, 2002.

ROBERT, C.; MC GRAW, S.; MASSICOTTE, L.; PRAVETONI, M.; GANDOLFI, F.; SIRARD, M.A. Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.67, p.1465-72, 2002.

ROMM, E.; NIELSEN, J.A.; KIM, J.G.; HUDSON, L.D. Myt1 family recruits histone deacetylase to regulate neural transcription. **Journal of Neurochemistry**, New York, v.93, p.1444-53, 2005

ROUX, K.H. Optimization and troubleshooting in PCR. **PCR Methods and Applications**, Woodbury, v.4, p.185-194, 1995.

SAKASHITA, E.; TATSUMI, S.; WERNER, D.; ENDO, H.; MAYEDA, A. Human RNPS1 and its associated factors: a versatile alternative pre-mRNA splicing regulator in vivo. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.24, p.1174-1187, 2004.

SAMMONS, M.; WAN, S.S.; VOGELL, N.L.; MIENTJES, E.J.; GROSVELD, G.; ASHBURNER, B.P. Negative regulation of the RelA/p65 transactivation function by the product of the DEK proto-oncogene. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.281, p.26802-12, 2006.

SAS, Statistical Analysis System Institute "SAS USER'S GUIDE: Statistic". SAS institute INC., Cary, NC, 2005

SCHEFE, J.H.; LEHMANN, K.E.; BUSCHMANN, I.R.; UNGER, T.; FUNKE-KAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's Ct difference" formula. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v.84, p.901-10, 2006.

SCHIER, A.F. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. **Science**, Stanford, v.316, p.406-407, 2007.

SCHNEIDER, J.; BUNEB, A.; HUBER, W.; VOLZ, J.; KIOSCHIS, P.; HAFNER, M.; POUSTKA, A.; SÜLTMANN, H. Systematic analysis of T7 RNA polymerase based *in vitro* linear RNA amplification for use in microarray experiments. **BMC Genomics**, London, v.5, p.1-9, 2004.

SELLAR, G.C.; WATT, K.P.; RABIASZ, G.J.; STRONACH, E.A.; LI, L.; MILLER, E.P.; MASSIE, C.E.; MILLER, J.; CONTRERAS-MOREIRA, B.; SCOTT, D.; BROWN, I.; WILLIAMS, A.R.; BATES, P.A.; SMYTH, J.F.; GABRA, H. OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. **Nature Genetics**, New York, v.34, p.337-43, 2003.

SHARK, K.B.; LEE, N.M. Cloning, sequencing and localization to chromosome 11 of a cDNA encoding a human opioid-binding cell adhesion molecule (OBCAM). **Gene**, Amsterdam, v.155, p.213-17, 1995.

SHIBOLET, O.; GIALLOURAKIS, C.; ROSENBERG, I.; MUELLER, T.; XAVIER, R.J.; PODOLSKY, D.K. AKAP13, a RhoA GTPase-specific guanine exchange factor, as a novel regulator of TLR2 signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.282, p.35308-17, 2007.

SIQUEIRA, F.; JORGE, E.C.; SANTOS, S.E.C.; AVELAR, G.A.; SOUZA JÚNIOR, M.D.; MELO, C.M.R.; COUTINHO, L.L.; LOPES, C.R.; GARCIA, J.F. Hibridização de cDNA bovino em *Macroarray* humano - *Macroarray*: uma importante ferramenta para análise de expressão gênica em bovinos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.33, p.80-85, 2004.

SIRARD, M.A.; DUFORT, I.; VALLEÉ, M.; MASSICOTE, L.; GRAVEL, C.; REGHENAS, H.; WATSON, A.J.; KING, W.A.; ROBERT, C. Potential and limitations of bovine-specific arrays for the analysis of mRNA levels in early development: preliminary analysis using a bovine embryonic array. **Reproduction, Fertility and Development**, Victoria, v.17, p.47-57, 2005.

SKOMMER, J.; WLODKOWIC, D.; DEPTALA, A. Larger than life: Mitochondria and the Bcl-2 family. **Leukemia Research**, Oxford, v.3, p.277-86, 2007.

SOURCE - Stanford On Line Universal resource for Clones and ESTs. Disponível em <<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>>, 2000.

STARR, R.; HILTON, D.J. SOCS: suppressores of cytokine signalling. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Bristol, v.30, p.1081-85, 1998.

STARR, R.; WILLSON, T.A.; VINEY, E.M.; MURRAY, L.J.L.; RAYNER, J.R.; JENKINS, B.J.; GONDA, T.J.; ALEXANDER, W.S.; METCALF, D.; NICOLA, N.A.; HILTON, D.J. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. **Nature**, London, v.387, p.917-21, 1997.

STITZEL, M.L.; SEYDOUX, G. Regulation of the oocyte-to-zygote transition. **Science**, Stanford, v.316, p.407-08, 2007.

STOYANOVA, R.; UPSON, J.J.; PATRIOTIS C.; ROSS, E.A.; HENSKE, E.P.; DATTA, K.; BOMAN, B.; CLAPPER, M.L.; KNUDSON, A.G.; BELLACOSA, A. Use of RNA amplification in the optimal characterization of global gene expression using cDNA microarrays. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v.201, p.359-65, 2004.

SUNDARAM, M.V. RTK/Ras/MAPK signaling. **Wormbook**, disponível em www.wormbook.org, v.11, p.1-19, 2006.

TANG, F.; KANEDA, M.; O'CARROLL, D.; HAJKOVA, P.; BARTON, S.C.; SUN, Y.A.; LEE, C.; TARAKHOVSKY, A.; LAO, K.; SURANI, M.A. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. **Genes & Development**, New York, v.21, p.644-48, 2007.

TESFAYE, D.; PONSUKSILI, S.; WIMMERS, K.; GILLES, M.; SCHELLANDER, K. Identification and quantification of differentially expressed transcripts in *in vitro*-produced bovine preimplantation stage embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.66, p.105-114, 2003.

THELIE, A.; PAPILLIER, P.; PENNETIER, S.; PERREAU, C.; TRAVERSO, J.M.; UZBEKOVA, S.; MERMILLOD, P.; JOLY, C.; HUMBLOT, P.; DALBIÉS-TRAN, R. Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation *in vitro* and *in vivo*. **BMC Developmental Biology**, London, v.7, p.125, 2007.

TILLY, J.L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, London, v.1, p.162-72, 1996.

TRUCHET, S.; CHEBROUT, M.; DJEDIAT, C.; WIETZERBIN, J.; DEBEY, P. Presence of permanently activated signal transducers and activators of transcription in nuclear interchromatin granules of unstimulated mouse oocytes and preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.71, p.1330-39, 2004.

TSUKAHARA, T.; KIMURA, S.; ICHIMIYA, S.; TORIGOE, T.; KAWAGUCHI, S.; WADA, T.; YAMASHITA, T.; SATO, N. Scythe/BAT3 regulates apoptotic cell death induced by papillomavirus binding factor in human osteosarcoma. **Cancer Sci**, Epub ahead of print, 2008.

VALLÉE, M.; ROBERT, C.; MÉTHOT, S.; PALIN, M.F.; SIRARD, M.A. Cross-species hybridizations on a multi-species cDNA microarray to identify evolutionarily conserved genes expressed in oocytes. **BMC Genomics**, London, v.7, p.113-126, 2006.

VAN GELDER, R.N.; VON ZASTROW, M.E.; YOOL, A.; DEMENT, W.C.; BARCHAS, J.D.; EBERWINE, J.H. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p.1663-67, 1990.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z.N.; VAN BOCKSTAELE, D.R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**, Oxford, v.36, p.165-75, 2003.

VERRECCHIA, F.; WAGNER, E.F.; MAUVIEL, A. Distinct involvement of the Jun-N-terminal kinase and NF- κ B pathways in the repression of the human COL1A2 gene by TNF- α . **EMBO reports**, Oxford, v.3, p.1069-74, 2002.

VIGNEAULT, C.; GILBERT, I.; SIRARD, M.A.; ROBERT, C. Using the histone H2a transcript as an endogenous standard to study relative transcript abundance during bovine early development. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.74, p.703-15, 2007.

VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; MASSICOTE, L.; SIRARD, M.A. Transcription factor expression patterns in bovine *in vitro*-derived embryos prior to maternal-zigotic transition. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.70, p.1701-09, 2004.

WADENBÄCK, J.; CLAPHAM, D.H.; CRAIG, D.; SEDEROFF, R.; PETER, G.F.; VON ARNOLD, S.; EGERTSDOTTER, U. Comparison of standard exponential and linear techniques to amplify small cDNA samples for microarrays. **BMC Genomics**, London, v.6, p.61-68, 2005.

WALDMANN, T.; SCHOLTEN, I.; KAPPES, F.; HU, H.G.; KNIPPERS, R. The DEK protein – an abundant and ubiquitous constituent of mammalian chromatin. **Gene**, Amsterdam, v.343, p.1-9, 2004.

WANG, S.; ZHANG, J.; ZHAO, A.; HIPKENS, S.; MAGNUSON, M.A.; GU, G. Loss of *Myt1* function partially compromises endocrine islet cell differentiation and pancreatic physiological function in the mouse. **Mechanisms of Development**, Limerick, v.124, p.898-910, 2007.

WANG, E. RNA amplification for successful gene profiling analysis. **Journal of Translational Medicine**, London, v.3, p.1-11, 2005

WANG, E.; MILLER, L.D.; OHNMACHT, G.A.; LIU, E.T.; MARINCOLA, F.M. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. **Nature Biotechnology**, New York, v.18, p.457-459, 2000.

WANG, W.; SOTO, H.; OLDHAM, E.R.; BUCHANAN, M.E.; HOMEY, B.; CATRON, D.; JENKINS, N.; COPELAND, N.G.; GILBERT, D.J.; NGUYEN, N.; ABRAMS, J.; KERSHENOVICH, D.; SMITH, K.; McCLANAHAN, T.; VICARI, A.P.; ZLOTNIK, A. Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.275, p.22313-23, 2000.

WARNER, C.M.; EXLEY, G.E.; MCELHINNY, A.S.; TANG, C. Genetic regulation of preimplantation mouse embryo survival. **The Journal of Experimental Zoology**, Philadelphia, v.282, p.272-79, 1998.

WATANABE, Y.F.; SCHWARZ, K.R.L.; MERIGHE, G.K.F.; MEIRELLES, F.V. Developmental potential and DNA damage of IVP bovine embryos with fast and slow development. **Theriogenology**, Los Altos, n.57, p.509, 2002.

WATANABE, Y.F. A fecundação in vitro e a reação acrossomal como critério de seleção para fertilidade em touros da raça nelore. 1998. 79 f. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

WICK, K.R.; WERNER, E.D.; LANGLAIS, P.; RAMOS, F.J.; DONG, L.Q.; SHOELSON, S.E.; LIU, F. Grb10 inhibits insulin-stimulated insulin receptor substrate (IRS)-phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by disrupting the association of IRS-1/IRS-2 with the insulin receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.278, p.8460-67, 2003.

WOLLMANN, Y.; SCHMIDT, U.; WIELAND, G.D.; ZIPFEL, P.F.; SALUZ, H.P.; HÄNEL, F. The DNA Topoisomerase II β binding protein 1 (TopBP1) interacts with poly (ADP-Ribose) polymerase (PARP-1). **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v.102, p.171-82, 2007.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, Los Altos, v.685, p.577-83, 2007.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSawe, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reproduction, Fertility, and Development**, Victoria, v.17, p.23-35, 2005.

WU, J.Y.; KAR, A.; KUO, D.; YU, B.; HAVLIOGLU, N. SRp54 (SFRS11), a regulator for tau Exon 10 alternative splicing identified by an expression cloning strategy. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.26, p.6739-47, 2006.

WU, B.; IGNOTZ, G.; CURRIE, W.B.; YANG, X. Dynamics of Maturation-Promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.56, p.253-59, 1997.

WYMANN, M.P.; ZVELEBIL, M.; LAFFARGUE, M. Phosphoinositide 3-kinase signalling-which way to target?. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v.24, p.366-76, 2003.

XU, Z.X.; ATANASOVA, A.T.; ZHAO, R.X.; CHANG, K.S. PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.23, p.4247-56, 2003.

YAMANE, K.; WU, X.; CHEN, J. A DNA damage regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.22, p.555-66, 2002.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.70, p.159-69, 2002.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.62, p.1209-17, 2000.

YASUDA, J.; WHITMARSH, A.J.; CAVANAGH, J.; SHARMA, M.; DAVIS, R.J. The JIP Group of Mitogen-Activated Protein Kinase Scaffold Proteins. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.19, p.7245-54, 1999.

ZENG, L.; HU, Y.; LI, B. Identification of TopBP1 as a c-Abl interacting protein and a repressor for c-Abl expression. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.280, p.29374-80, 2005.

ZENG, F.; BALDWIN, D.A.; SCHULTZ, R.M. Transcript profiling during preimplantation mouse development. **Developmental Biology**, New York, v.272, p.483-96, 2004.

ZHENG, P., PATEL, B., MC MENAMIN, M., PAPROCKI, A.M., SCHRAMM, R.D., NAGL JR, N.G., WILSKER, D., WANG, X., MORAN, E., LATHAM, K.E. Expression of genes encoding chromatin regulatory factors in developing rhesus monkey oocytes and preimplantation stage embryos: possible roles in genome activation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.70, p.1419-27, 2004.

ZHU, B.; XU, F.; BABA, Y. An evaluation of linear RNA amplification in cDNA microarray gene expression analysis. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v.87, p.71-70, 2006.

Anexo A. Exemplo de um gene para os cálculos de filtragem na horizontal, seleção dos outliers e normalização vertical.

Cálculo da mediana horizontal por gene, dentro do grupo experimental

Index	Gene symbol	L8SH33 BLOCO A	L8SH33 BLOCO B	L8SH57 BLOCO A	L8SH57 BLOCO B	L8SH58 BLOCO A	L8SH58 BLOCO B	mediana linha
A-A-A-F	CARM1	142321	135874	53692	143940	94139	190454	139098

Divisão dos valores brutos pela mediana horizontal, dentro do grupo experimental

Index	Gene symbol	R8SH34 BLOCO A	R8SH34 BLOCO B	R8SH63 BLOCO A	R8SH63 BLOCO B	mediana linha
A-A-A-F	CARM1	59342	48820	177521	43575	54081

Index	Gene symbol	L8SH33 BLOCO A	L8SH33 BLOCO B	L8SH57 BLOCO A	L8SH57 BLOCO B	L8SH58 BLOCO A	L8SH58 BLOCO B
A-A-A-F	CARM1	1,0232	0,9768	0,3860	1,0348	0,6768	1,3692

Index	Gene symbol	R8SH34 BLOCO A	R8SH34 BLOCO B	R8SH63 BLOCO A	R8SH63 BLOCO B
A-A-A-F	CARM1	1,0973	0,9027	3,2825	0,8057

Seleção dos outliers (< 0.3;>3.0) sob os valores brutos e cálculo da mediana vertical, de cada coluna, por repetição, dentro do grupo experimental

Index	Gene symbol	L8SH33 BLOCO A	L8SH33 BLOCO B	L8SH57 BLOCO A	L8SH57 BLOCO B	L8SH58 BLOCO A	L8SH58 BLOCO B
A-A-A-F	CARM1	142321	135874	53692	143940	94139	190454
	mediana coluna	146242	155687	234876	187436	162165	168124

Index	Gene symbol	R8SH34 BLOCO A	R8SH34 BLOCO B	R8SH63 BLOCO A	R8SH63 BLOCO B
A-A-A-F	CARM1	59342	48820		43575
	mediana coluna	79770	104918	96095	115004

Divisão dos valores brutos pela mediana da coluna, dentro do grupo experimental, com cálculo das medianas, médias, máximo, mínimo, 1o e 3o quartis e desvio padrão

Index	Gene symbol	L8SH33 BLOCO A	L8SH33 BLOCO B	L8SH57 BLOCO A	L8SH57 BLOCO B	L8SH58 BLOCO A	L8SH58 BLOCO B
A-A-A-F	CARM1	0,973	0,873	0,229	0,768	0,581	1,133
	mediana	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	média	1,487	1,404	1,268	1,322	1,506	1,382
	máximo	11,657	10,175	19,320	21,754	24,949	27,149
	mínimo	0,117	0,056	0,084	0,120	0,106	0,116
	1 quartil	0,616	0,612	0,731	0,610	0,584	0,616
	3 quartil	1,694	1,628	1,391	1,448	1,770	1,584
	desvio padrão	1,448	1,281	1,126	1,328	1,694	1,596

Index	Gene symbol	R8SH34 BLOCO A	R8SH34 BLOCO B	R8SH63 BLOCO A	R8SH63 BLOCO B
A-A-A-F	CARM1	0,744	0,465		0,379
	mediana	1,000	1,000	1,000	1,000
	média	1,183	1,086	1,115	1,077
	máximo	5,071	3,995	5,962	5,311
	mínimo	0,141	0,195	0,116	0,131
	1 quartil	0,633	0,726	0,711	0,712
	3 quartil	1,528	1,330	1,360	1,323
	desvio padrão	0,742	0,526	0,621	0,548

Anexo B – Legenda dos mapas e vias de regulação gênica.

