# Universidade de São Paulo

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

**Tiago Henrique Camara De Bem** 

Efeito da pré-maturação sobre o desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos à ativação partenogenética e transferência de núcleo

# **Tiago Henrique Camara De Bem**

# Efeito da pré-maturação sobre o desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos à ativação partenogenética e transferência de núcleo

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

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Lima Verde Leal

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

D286e

De Bem, Tiago Henrique Camara

Efeito da pré-maturação sobre o desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos à ativação partenogenética e transferência de núcleo / Tiago Henrique Camara De Bem. -- Pirassununga, 2009.

95 f.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Ciências Básicas.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Lima Verde Leal.

1. Pré-maturação 2. Butirolactona I 3. Partenogênese 4. Clonagem 5. BDNF. I. Título.

# AGRADEÇO A DEUS pela infinita bondade, por estar na frente de todas as minhas conquistas e principalmente por sempre estar do meu lado renovando minhas forças para enfrentar as dificuldades.

#### **DEDICO ESTE TRABALHO:**

Aos meus pais, Celso Antoninho De Bem e Rita de Cássia Biagini Camara De Bem pelo exemplo de determinação que sempre me transmitiram e por sempre fazerem o "impossível" para mim durante toda minha vida. Todas as conquistas que um dia virei alcançar, antes, serão de vocês.

E aos meus irmãos, **Gustavo**, **Samuel** e **Eduardo** pelo companheirismo, por sempre me incentivarem e pelo total apoio durante todas as decisões que necessitei tomar.

#### **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

#### À Fabiana Fernandes Bressan,

por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, principalmente nos que realmente precisei. Por sempre me incentivar pessoalmente e cientificamente, por me compreender e principalmente por tornar minha vida mais completa. Sou abençoado por ter ao lado uma pessoal tão especial como você.

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

À **Prof**<sup>a</sup> **Dr**<sup>a</sup> **Cláudia Lima Verde Leal** pela orientação, incentivo e principalmente pela confiança em mim depositada. Sempre presente nos momentos difíceis durante a realização deste trabalho e quando realmente precisei, mesmo tão longe, sempre "esteve tão perto".

Ao **Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles** pelo apoio, confiança, pelas oportunidades e por sempre me incentivar, contribuindo para a formação de um pensamento científico cada vez mais sólido.

Ao **Dr. Paulo Roberto Adona** imprescindível pra a realização deste trabalho, por toda paciência e ensinamento a mim transmitido não somente durante o mestrado, mas durante toda a convivência no laboratório. Sempre prestativo e incentivador, mostrando sempre o lado positivo das coisas.

À Raquel Cellin Rochetti que sempre muito prestativa contribuiu de forma ímpar para a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Felipe Perecin** pela amizade, confiança e pela harmoniosa parceria durante a realização dessa dissertação. Sempre solidário e prestativo para discussões e esclarecimentos científicos.

À **Giovana Krempel Fonseca Merighe** pelo exemplo de dedicação, por toda paciência e por todo ensinamento a mim transmitido.

Ao **Nilton Pedro dos Santos** pela amizade, pelos conselhos e por sempre mostrar que a vida é mais simples do que parece.

Ao amigo e "companheiro de manipa" **Juliano Rodrigues Sangali**, por colaborar durante as rotinas de clonagem e tornar a convivência diária no laboratório mais descontraída.

Ao amigo **Moysés Miranda dos Santos**, por sempre ser tão solícito em tudo que precisei, principalmente durante as rotinas de clonagem e discussões sobre estatística.

Ao amigo e companheiro de pesca **Leonardo do Amaral** (**Léo**), sempre que precisamos esteve na estrada transportando os ovários fundamentais para a realização deste e de muitos outros trabalhos do laboratório.

Ao casal **André F. Cesar de Andrade** e **Simone M. M. Kitamura Martins** pela amizade, pelos inúmeros momentos de descontração essenciais para enfrentar as dificuldades do dia-a-dia e pela ajuda durante a formatação da dissertação.

Aos amigos **Patrícia Fernanda** e **Rodrigo da Costa Gomes** pela amizade e ajuda durante a elaboração do resumo em inglês.

À Conceição Roldão e Layla Denófrio pela paciência e principalmente pela plena disponibilidade quando necessitei.

Aos amigos, colegas e agregados do Laboratório de Histologia, LMMD e da Pósgraduação, pela convivência ou por contribuírem de alguma forma: **Prof Caju**, **Christina**, **Edson**, **Eva**, **Prof. Heidge**, **Henrique**, **Kátia**, **Lígia**, **Lindsay**, **Lucas**, **Prof. Maia**, **Márcia**, **Marcos**, **Paulinho**, **Pedrinho**, **Peninha**, **Viviane** e **Zé Rodrigo**.

A toda a **minha família**, que sempre compreenderam minha ausência em diversas ocasiões.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, onde este trabalho foi realizado.

E à **FAPESP** e ao **CNPQ** pela concessão da bolsa de estudo.

#### **RESUMO**

DE BEM, T.H.C. Efeito da pré-maturação sobre o desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos à ativação partenogenética e transferência de núcleo. 2009. 95f. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

As taxas de produção embrionária tanto da FIV (30-40%) como da TN (23%) ainda estão aquém do esperado. Desta forma, a pré-maturação com inibidores do ciclo celular é uma das alternativas que vem sendo estudada para aumentar a competência dos oócitos utilizados na PIV, na tentativa de otimizar o sucesso das biotécnicas. Sabe-se que neurotrofinas desempenham funções no sistema reprodutor. O BDNF é um exemplo de neurotrofina que parece estar relacionada com a maturação dos oócitos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi de aperfeiçoar a pré-maturação e a maturação in vitro de oócitos bovinos submetidos posteriormente à ativação partenogenética, visando seu uso na biotécnica de transferência de núcleo. Oócitos bovinos foram submetidos à maturação na presença (MIV/BD) ou ausência (MIV) de BDNF ou pré-maturados com BLI e suplementados (BL/BD) ou não (BL) com a neurotrofina. Posteriormente foram avaliados quanto à taxa de maturação (metáfase II), ativação (formação de prónúcleo) e desenvolvimento embrionário (produção e qualidade dos blastocistos). Não houve diferença (P>0,05) entre taxas de MII após a maturação com ou sem BDNF. Porém, o grupo pré-maturado e suplementado (BL/BD n=73; 91,2%) apresentou maior taxa de MII (P<0,05) em relação ao grupo não suplementado (BL n=66; 76,7%). Oócitos maturados nas mesmas condições foram ativados quimicamente para análise do desenvolvimento embrionário. Os grupos MIV/BD

(n=30; 71,4%) e MIV (n=41; 91.1%) apresentaram diferença (P<0,05) em relação à taxa de ativação. Porém, não foi observada diferença quanto aos outros parâmetros do desenvolvimento. Quando os oócitos foram pré-maturados a taxa de clivagem do grupo suplementado (BL/BD: n=227; 65,2%) foi superior (P<0,05) ao grupo não suplementado (BL: n=187; 57,7%), mas não foram observadas diferenças (P>0,05) para os outros parâmetros de desenvolvimento. A qualidade dos embriões ativados também não foi afetada pelos tratamentos. Os grupos submetidos à TN (MIV e BL/BD) apresentaram diferenças (P<0,05) para extrusão do 1℃P (n=639; 63,5% e n=693; 69,5%, respectivamente) e para taxa de fusão (n=345; 72,9% e n=397; 79,2%, respectivamente) não havendo diferença para nenhum outro parâmetro avaliado. A qualidade dos embriões clonados também foi avaliada e não foi observada diferença. Após a transferência dos embriões dos grupos MIV (n=28) e BL/BD (n=26) para as receptoras, os grupos foram capazes de produzir gestação avançadas (10,7 e 11,5%, respectivamente) de forma similar (P>0,05). Com base nestes resultados podemos concluir que a suplementação, tanto da maturação como a pré-maturação não causa prejuízo no posterior desenvolvimento embrionário. Ainda, embriões clonados produzidos a partir de oócitos bloqueados são capazes de estabelecer gestações avançadas em bovinos.

Palavras- chave: pré-maturação, butirolactona I, partenogênese, clonagem, BDNF.

#### **ABSTRACT**

DE BEM, T.H.C. Effect of pre-maturation on embryo development of oocytes submitted to parthenogenetic activation and nuclear transfer. 2009. 95p. Dissertation (Master) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

Embryo production rates obtained from both IVF (30-40%) and NT (23%) are still below the expected values. Therefore, oocyte pre-maturation using cell cycle inhibitors is one of the alternatives which has been studied to increase the competence of oocytes used for IVP, as an attempt to optimize the success rates of these biotechniques. Neurotrophins are known to play several roles in the reproductive system. BDNF is an example of a neurotrophin that seems to be related to oocyte maturation. Therefore, the objective of this study was to improve techniques of pre-maturation and maturation of bovine oocytes submitted to parthenogenetic activation, aiming for its use on cloning by nuclear transfer. Bovine oocytes were submitted to maturation either in presence (IVM/BD) or absence (IVM) of BDNF or pre-matured with BLI and supplemented (BL/BD) or not (BL) with the neurotrophin. Groups were evaluated for maturation rates (metaphase II), activation (pro-nucleus formation) and embryo development (blastocyst formation rate and quality). There was no difference (P>0.05) in MII rate after the maturation with or without BDNF. However, pre-maturation in the supplemented group (BL/BD, n=73; 91.2%) resulted in higher MII rate (P<0.05) when compared with the nonsupplemented group (BL, n=66; 76.7%). Oocytes which were matured under the same conditions were also activated chemically for embryonic development analysis. Activation rates were different (P<0.05) from IVM/BD groups (n=30; 71.4%) and IVM (n=41; 91.1%). However, no difference were observed for development parameters. When the oocytes were prematured, cleavage rates in the supplemented group were superior (P<0.05) than non supplemented group (BL/BD: n=227; 65.2%) and (BL: n=187; 57.7%), but no difference was observed for other developmental parameters. Embryo quality was also evaluated and no difference was observed between treatments. Groups submitted to NT (IVM and BL/BD) differed regarding (P<0.05) the 1stPB extrusion (n=639; 63.5% and n=693; 69.5%, respectively) and fusion rate (n=345; 72.9% and n=397; 79.2%, respectively), but did not present differences for other evaluated parameters. Embryo quality was evaluated again and no differences were observed. After the embryos were transferred to recipient cows, groups IVM (n=3; 10.7%) and BL/BD (n=3; 11.5%) were capable of producing advanced gestations at similar rates (P>0.05). Based on these results, it may be concluded that supplementation of both maturation and pre-maturation does not impair embryonic development. Additionally, cloned embryos produced from blocked oocytes are able to establish advanced gestation in cattle.

Key- words: pre-maturation, butyrolactone I, parthenogenesis, cloning, BDNF.

#### **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Imagem referente a oócitos em diferentes fases de maturação. (A) Oócito do grupo controle, seta demonstra a vesícula germinativa (VG), indicativo que o oócito colocado para o bloqueio e/ou maturação apresentava-se imaturo, aumento 20X. (B) Oócito após ser ou bloqueado e/ou maturado, seta indica presença do 1°CP, indicativo que o mesmo encontra-se em fase de metáfase (MII), aumento 40X.
<b>Figura 2</b> - Imagens representativas de oócitos após a ativação. (A) Oócito ativado, seta indica a presença de pró-núcleo, aumento 20X. (B) Oócito não ativado, seta indica presença de metáfase, aumento 40x
Figura 3 - Imagens digitalizadas representativas dos blastocistos ativados submetidos à técnica de TUNEL para avaliação da fragmentação do DNA. (A) Blastocisto corado com Hoescht 33342 para contagem do número total de células; a seta indica uma célula. (B) Mesmo blastocisto, avaliado em relação à fragmentação de DNA; a seta indica uma célula com fragmentação. (C) Blastocisto do grupo controle negativo, com ausência de células com fragmentação de DNA. (D) Blastocisto do grupo controle positivo, onde todas as células foram fragmentadas com DNAse. Todas as fotos foram tiradas com aumento de 20x
<b>Figura 4</b> - Imagem referente ao cultivo <i>in vitro</i> e citogenética. (A) estabelecimento da linhagem celular doadora de núcleo, seta fina mostra um fragmento de tecido da pele e seta grossa demonstra fibroblastos aderidos no fundo da placa de Petri, aumento 10X. (B) uma metáfase da cultura com normalidade cromossômica (n=60), aumento 100X.
<b>Figura 5</b> - Imagens referentes ao desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos submetidos à transferência de nucleo. (A) Embrião duas células52
<b>Figura 6</b> - Taxas de prenhezes diagnosticadas positivamente aos 30, 60, 90 e 120 dias de gestação em relação ao total de embriões transferidos

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Maturação nuclear de oócitos maturados <i>in vitro</i> com ou sem BDNF56
Tabela 2 - Taxa de formação de pró-núcleo de oócitos maturados com ou sem         BDNF       57
<b>Tabela 3-</b> Desenvolvimento embrionário de oócitos maturados <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com BDNF e submetidos à ativação partenogenética59
<b>Tabela 4</b> - Fragmentação de DNA dos embriões produzidos <i>in vitro</i> após ativação partenogenética de oócitos maturados na ausência ou presença de BDNF59
<b>Tabela 5</b> - Maturação nuclear de oócitos pré-maturados com ou sem BDNF, seguido de maturação <i>in vitro</i> sem BDNF
Tabela 6 - Taxa de formação de pró-núcleo de oócitos pré-maturados com ou sem         BDNF seguido de maturação in vitro sem BDNF61
<b>Tabela 7</b> - Desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos à pré-maturação <i>in vitro</i> suplementados ou não com BDNF, seguido de maturação <i>in vitro</i> sem BDNF e ativação partenogenética
<b>Tabela 8</b> - Avaliação da fragmentação de DNA dos embriões produzidos <i>in vitro</i> após ativação partenogenética de oócitos pré-maturados na ausência ou presença de BDNF
<b>Tabela 9</b> - Porcentagem da normalidade cromossômica das linhagens celulares doadoras de núcleo utilizadas nos experimentos de transferência de núcleo64
<b>Tabela 10</b> - Desenvolvimento embrionário dos oócitos maturados <i>in vitro</i> e dos oócitos submetidos à pré-maturação na presença de BDNF, seguido de maturação sem BDNF e a transferência de núcleo
<b>Tabela 11</b> - Fragmentação de DNA nos embriões produzidos <i>in vitro</i> após a transferência de núcleo.

#### **LISTA DE ABREVIATURAS**

1°CP 1°Corpúsculo polar

6-DMAP 6-dimetilaminopurina

AMPc Adenosina monofosfato cíclica

ANOVA Análise de variância

BDNF Brain derived neurotrofic factor (Fator neurotrófico derivado do

cérebro)

BLI Butirolactona I

BSA Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)

CDKs Cyclin dependent kinases (Ciclinas dependentes de cinases)

COC Complexo cumulus-oócito

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido Desoxirribonucléico

FIV Fertilização in vitro

FSH Follicle stimulating hormone (Hormônio Folículo Estimulante)

HSOF SOF com tampão Hepes

IDA Índice de apoptose

IP3 Inositol trifosfato

LH Luteinizing hormone (Hormônio Luteinizante)

MAPK Mitogen activated protein kinase (Proteína cinase ativada por

mitógenos)

mg Miligrama
MI Metáfasel
MII Metáfasell

MIV Maturação in vitro

mL Mililitro
mm Milímetro
mM Milimolar

MPF Maturation promoting factor (Fator promotor da maturação)

NGF Nerve growth factor (Fator de crescimento do nervo)

NT-3 Neurotrofina-3

PBS Phosphate buffered saline (Solução salina com tampão fosfato)

PIV Produção in vitro

RNA Ácido Ribonucléico

RNAm RNA mensageiro

SFB Soro Fetal Bovino

SOF Synthetic oviduct fluid (Fluido sintético de oviduto)

TCM Tissue Culture Medium (Meio de cultivo de tecidos)

TN Transferência de núcleo

TNCS Transferência de núcleo de células somáticas

VG Vesícula Germinativa

μm Micrômetro

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	HIPÓTESES	22
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
	3.1 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE	24
	3.2 MATURAÇÃO DO OÓCITO	26
	3.3 PRÉ-MATURAÇÃO	29
	3.4 FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO	31
	3.5 ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA	33
	3.6 TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	
	4.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO	40
	4.2 COLETA DE OVÁRIOS E OÓCITOS	40
	4.3 MATURAÇÃO IN VITRO	
	4.4 PRÉ-MATURAÇÃO	41
	4.5 FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO	42
	4.6 AVALIAÇÃO DA TAXA DE MATURAÇÃO	
	4.7 ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA	43
	4.8 AVALIAÇÃO DA TAXA DE FORMAÇÃO DE PRÓ-NÚCLEO	44
	4.9 AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA DOS EMBRIÕES	45
	4.10 ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM CELULAR DOADORA DE NÚCLEO	)46
	4.11 ANÁLISE CROMOSSÔMICA DA LINHAGEM CELULAR P	OR 47
	4.12 CONGELAÇÃO DOS FIBROBLASTOS PARA CLONAGEM	48
	4.13 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA A TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO	.49
	4.14 TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO	50
	4.15 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES	53
	4.16 ACOMPANHAMENTO DAS GESTAÇÕES	53
	4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5	RESULTADOS	56
	5.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA TAXA DE MATURAÇÃO, FORMAÇ DE PRÓ-NÚCLEO E DESENVOLVIMENTO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA OÓCITOS SUPLEMENTADOS OU NÃO COM BDNF DURANTE A MATURAÇIN VITRO	DE ÃO 56

5.1.2 TAXA DE FORMAÇÃO DE PRÓ-NÚCLEO	57
5.1.3 DESENVOLVIMENTO IN VITRO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA DE OÓCITOS	
SUBMETIDOS À ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA	57
5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA TAXA DE MATURAÇÃO, FORM DE PRÓ-NÚCLEO E DESENVOLVIMENTO E QUALIDADE EMBRIONÁF OÓCITOS SUPLEMENTADOS OU NÃO COM BDNF DURANTE À MATURAÇÃO SEGUIDO DE MATURAÇÃO SEM BDNF	RIA DE PRÉ- 60 60
5.3 EXPERIMENTO 4: TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO	64 S PRÉ <b>-</b>
5.4 EXPERIMENTO 5: DESENVOLVIMENTO IN VIVO DE EMB CLONADOS	
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ILLI LILITOIAU DIDLIUGNAFIUAU	

#### 1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse científico e comercial na produção *in vitro* (PIV) de embriões impulsionou grandes avanços na área de biotecnologia aplicada, mais especificamente nas técnicas de reprodução assistida como a fecundação *in vitro* (FIV) e a clonagem por transferência de núcleo (TN). Porém, mesmo com os avanços das biotécnicas, a PIV de embriões está relativamente estável e as taxas de produção de embriões da FIV (30-40%) (MAYES; SIRARD, 2001; SIRARD et al., 2006) e da TN (23%) (YANG et al., 2006) ainda estão aquém do esperado.

As ineficiências relacionadas à TN são atribuídas a diversos fatores, muitos desses ainda não muito compreendidos, tais como: o estágio do ciclo celular da célula doadora de núcleo (COLLAS et al., 1992), incompleta ou ineficiente reprogramação nuclear após a clonagem (STICE et al., 1996), interações entre a célula doadora de núcleo e o citoplasma do oócito receptor (CAMPBELL et al., 1996) anormalidades fetais (CHAVATTE-PALMER et al., 2004) e anormalidades placentárias (HASHIZUME et al., 2002; LEE et al., 2004).

O oócito possui um papel chave para um saudável desenvolvimento embrionário, pois a capacidade do oócito maturar, suportar os estádios de desenvolvimento pré-implantação, implantação e atingir o desenvolvimento a termo é determinada como competência de desenvolvimento e está relacionada com sua qualidade intrínseca, adquirida durante o curso de foliculogênese (HUSSEIN et al., 2006; GILCHRIST; THOMPSON, 2007).

Sabe-se que durante o crescimento do oócito e no período de maturação oocitária há o acúmulo de moléculas (RNAm e proteínas) que dão suporte às fases

iniciais da embriogênese (DE LA FUENTE; EPPIG, 2001; HUSSEIN et al., 2006). O ambiente ao qual os oócitos são submetidos durante a MIV, porém, resulta na redução do acúmulo destas moléculas, levando conseqüentemente a um declínio no desenvolvimento embrionário (DIELEMAN et al., 2002). Isto sugere que este ambiente *in vitro* ainda não mimetiza completamente as condições naturais e necessárias para um completo desenvolvimento do oócito.

Um dos grandes desafios da biologia reprodutiva é decifrar os mecanismos envolvidos na competência do oócito (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). Sabe-se, porém, que a maturação oocitária é um processo fundamental, visto que as etapas seguintes do processo de PIV de embriões são dependentes da maturação completa dos oócitos.

A remoção do oócito do seu ambiente folicular afeta o desenvolvimento embrionário posterior, pois os oócitos aspirados de folículos de 2-6 mm retomam de imediato a meiose sem estarem totalmente capacitados (DIELEMAN et al., 2002). Desta forma, a utilização de metodologias que minimizem os impactos da remoção folicular precoce torna-se bastante interessante.

A pré-maturação com inibidores do ciclo celular é uma das alternativas para aumentar a competência dos oócitos que são submetidos à PIV. O bloqueio da meiose por um período determinado durante a pré-maturação proporcionaria um tempo adicional ao oócito para que o mesmo possa finalizar sua capacitação, antes de ser submetido à MIV.

A pré-maturação isoladamente não capacita o oócito (LONERGAN et al., 2000; ADONA; LEAL, 2004), porém, pode ser utilizado como uma alternativa para a suplementação dos meios, utilizando fatores que auxiliem e proporcionem um ambiente *in vitro* mais adequado para sua capacitação.

A ativação partenogenética é um modelo bastante utilizado para avaliar a qualidade do oócito uma vez que esta nos fornece meios de mensurar a competência citoplasmática do oócito sem a intervenção de fatores de desenvolvimento ligados ao espermatozóide. Além disso, é aceito como um modelo para avaliação da viabilidade do oócito para estudos tanto de transferência como de reprogramação de núcleo (DE SOUSA et al., 2002; LIU; AOKI, 2002).

Desta forma, o presente estudo teve por **objetivo geral** aperfeiçoar a prématuração e maturação de oócitos bovinos submetidos posteriormente à ativação partenogenética, visando seu uso na biotécnica de transferência de núcleo. Os **objetivos específicos** foram de avaliar o desenvolvimento *in vitro* e a qualidade embrionária de oócitos bovinos submetidos à ativação partenogenética e transferência de núcleo, bem como o desenvolvimento *in vivo* de embriões clonados.

#### 2 HIPÓTESES

- A pré-maturação não prejudica o desenvolvimento e qualidade embrionária de oócitos bovinos submetidos à ativação partenogenética.
- 2) A suplementação com BDNF dos meios utilizados na maturação e prématuração proporciona melhor competência meiótica (taxa de maturação) e de desenvolvimento (produção de embriões) dos oócitos quando comparados com aqueles não suplementados.
- 3) O citoplasma de oócitos pré-maturados é capaz de reprogramar o núcleo de uma célula somática e produzir gestações avançadas.



#### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### 3.1 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

O termo oogênese é utilizado para designar o processo de formação das células reprodutivas femininas. Este processo inicia-se nas primeiras fases do desenvolvimento fetal, podendo terminar meses ou anos mais tarde variando entre as espécies. Em bovinos, sabe-se que a meiose inicia-se por volta dos 80 dias de gestação (RÜSSE, 1983). Nesta fase, os oócitos progridem no ciclo celular até a fase de diplóteno da prófase I quando ocorre o primeiro bloqueio meiótico (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O núcleo do oócito nesse período é identificado morfologicamente pela visualização da vesícula germinativa (VG), que caracteriza um núcleo bem desenvolvido, porém imaturo. A quebra da vesícula germinativa marca a retomada da meiose e o início do processo de maturação oocitária. *In vivo*, isto ocorre quando há a estimulação do hormônio luteinizante (LH). Após 24 horas, o ciclo celular é novamente interrompido resultando no segundo bloqueio da meiose, porém desta vez na fase de metáfase II (MII) (HAFEZ; HAFEZ 2004).

O oócito é ovulado em MII, mas o ciclo celular só prosseguirá para as próximas fases se ocorrer a fecundação do oócito pelo espermatozóide ou a ativação partenogenética, que provocam a posterior estimulação dos ciclos mitóticos do desenvolvimento embrionário.

A foliculogênese refere-se à formação dos folículos ovarianos que envolvem os oócitos até o momento da ovulação. Esse processo inicia-se com o surgimento dos folículos primordiais, momento em que uma camada única de células pavimentosas migra e se dispõe em torno do oócito (MAYES; SIRARD, 2002).

A partir dos folículos primordiais formam-se os folículos primários onde as células pavimentosas da camada inicial tornam-se cubóides. Esta fase também é caracterizada pela formação da zona pelúcida e das junções comunicantes entre o oócito e as células da granulosa (RÜSSE, 1983).

Com o crescimento das células foliculares surge o folículo secundário com a formação de pelo menos duas camadas de células da granulosa em torno do oócito (HYTTEL et al., 1997).

O fluido folicular começa a ser secretado entre as células da granulosa e é importante para nutrir o oócito e as células que o circundam. Este fluido vai se acumulando no espaço intersticial promovendo a formação da cavidade antral ou antro, que caracteriza o folículo antral ou terciário. Com a formação do antro, o oócito primário passa a ocupar uma posição deslocada para um dos lados do folículo ficando rodeado por várias camadas de células denominadas de *cumulus oophorus* (ARAUJO et al., 2007).

Neste momento, o oócito diminuiu o ritmo de crescimento e a partir de então o folículo continua crescendo em tamanho até tornar-se pré-ovulatório. Após o pico de LH, a meiose do oócito é retomada e o mesmo é ovulado em MII (CALLESEN et al., 1986).

#### 3.2 MATURAÇÃO DO OÓCITO

A maturação *in vivo* do oócito tem início logo após o pico ovulatório de LH quando o oócito retoma a meiose. *In vitro*, com a retirada do oócito do seu folículo inicia-se espontaneamente a maturação, pois o efeito inibidor exercido pelas células foliculares cessa.

As células da granulosa cooperam ativamente para o crescimento do oócito e este inicia-se juntamente com o crescimento folicular durando até a formação do antro. Durante esse período o oócito aumenta mais de três vezes seu tamanho atingindo cerca de 120µm de diâmetro. Este aumento é resultado do acúmulo, organização e distribuição de organelas, além de síntese e armazenamento de RNAs e proteínas necessárias para a maturação, fecundação e posterior desenvolvimento embrionário (DE LA FUENTE; EPPIG, 2001; HUSSEIN et al., 2006).

As transformações nucleares e citoplasmáticas estão ligadas a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas. As mudanças nucleares são caracterizadas pela condensação dos cromossomos e quebra da vesícula germinativa e ao longo deste processo o oócito passa pelas fases de diacinese, metafase I, anáfase I e telófase I, completando a primeira divisão meiótica, e então em seguida, progride para MII da segunda divisão meiótica.

Neste momento, além de ocorrer a divisão do material genético em dois grupos com a metade do número original de cromossomos, há a divisão assimétrica do citoplasma, que origina duas células com tamanhos diferentes, uma pequena chamada de 1° corpúsculo polar (1°CP) e a outra mai or designada de oócito secundário (CAN et al., 2003).

A maturação nuclear é atingida mais facilmente que a citoplasmática, visto que o oócito extrui o 1° CP espontaneamente após a sua remoção do interior do folículo (RICHARD; SIRARD, 1996).

Porém, somente a maturação nuclear não suporta o posterior desenvolvimento embrionário, então, concomitantemente ocorre a maturação citoplasmática. Nesta, ocorrem mudanças estruturais e bioquímicas que se iniciam na fase de VG e duram até o final da MII.

A maturação citoplasmática é caracterizada pela complexa reorganização das organelas que migram pelos microtúbulos e microfilamentos. No oócito imaturo, as mitocôndrias e o complexo de Golgi localizam-se na periferia do oócito, porém, quando ocorre a maturação estas organelas se organizam e se acumulam nas proximidades do núcleo (HYTTEL et al., 1997).

Dentre as organelas citoplasmáticas do oócito, destacam-se os grânulos corticais que são liberados após a fecundação. Estes são responsáveis pela reação cortical, ou seja, promovem a modificação dos receptores e endurecimento da zona pelúcida para impedir a polispermia (CHERR et al., 1988). Os grânulos corticais, produzidos pelo complexo de Golgi e situados originalmente no centro do oócito, migram para a periferia do mesmo e ancoram-se na membrana plasmática (CRAN; ESPER, 1990).

Os oócitos são mantidos em MII devido à presença do fator promotor da maturação (MPF) e da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), dois dos principais fatores envolvidos na regulação da maturação oocitária. O MPF é um heterodímero composto por uma cinase catalítica (p34<sup>cdc2</sup> ou CDK1) e uma subunidade de ciclina B regulatória (ABRIEU et al., 2001; JONES, 2004). Ele é responsável por modificações morfológicas que ocorrem durante a maturação do

oócito, regulando a condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear e a reorganização dos microtúbulos (KIM et al., 2000). Em oócitos em estágio de VG, o MPF mantém-se em baixa atividade. Quando ocorre a retomada da meiose, o MPF torna-se ativo, apresentando máxima atividade em MI. Sofre depois um declínio transitório entre MI e MII e nesta última fase mantém-se em máxima atividade (MOTLIK et al., 1998). A sua inativação na fase de MII ocorre quando há a fecundação ou a ativação partenogenética do oócito e é necessária para que ocorra o desbloqueio da meiose e sua finalização e o início dos processos do desenvolvimento embrionário (TAIEB et al., 1997).

As proteínas pertencentes ao grupo da MAPK pertencem à família das serina/treonina cinases. A ampla faixa de atuação das MAPKs é medida pela fosforilação de diversos substratos que incluem fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto. A ativação da MAPK em oócitos bovinos ocorre após 8 horas de cultivo *in vitro* e apresenta um aumento gradual até 12-14 horas, se mantendo estável até o final da maturação (KUBELKA et al., 2000).

A MAPK possui duas principais isoformas, a ERK1 e a ERK2. Em oócitos bovinos estas duas isoformas são ativadas com a proximidade do rompimento da VG. Isto sugere que a MAPK não é requerida para o reinício da meiose, mas é essencial para eventos depois do rompimento da VG (KANO et al., 2000; LEFEBVRE et al., 2002).

### 3.3 PRÉ-MATURAÇÃO

Desde a fase de foliculogêsene, durante o crescimento do oócito até pouco tempo antes da ovulação, o oócito fica bloqueado naturalmente no estádio de vesícula germinativa através de sinais inibidores sintetizados pelas células foliculares e da granulosa (SIRARD et al., 1998). Um dos fatores responsáveis pela manutenção dos oócitos bloqueados nesta fase é a presença de altos níveis de adenosina monofosfata cíclica (AMPc) presente nos oócitos. A redução nos níveis de AMPc é a condição necessária para promoção da maturação oocitária (BILODEAU-GOESEELS, 2003; EYERS et al., 2005).

Em procedimento de maturação *in vitro*, os oócitos são aspirados de folículos de aproximadamente 2-6mm. Nesta fase, os oócitos não completaram totalmente sua maturação (ADONA et al., 2008), assim, submetidos imediatamente à maturação resultam em baixas taxas embrionárias (30 à 40%) (MAYES; SIRARD, 2001; SIRARD et al., 2006).

A pré-maturação é uma das alternativas que vem sendo estudada para aumentar a competência dos oócitos que serão submetidos à PIV, visto que o bloqueio proporciona um tempo adicional ao oócito para que o mesmo possa finalizar sua "capacitação", antes de ser submetido à maturação propriamente dita (HENDRIKSEN et al., 2000; PONDERATO et al., 2001; ADONA et al., 2008).

O ciclo celular pode ser bloqueado *in vitro* por drogas que mantenham altas as concentrações de AMPc no interior do oócito ou através da inibição específica de ciclinas dependentes de cinases (CDKs) como a butirolactona I (BLI) e a roscovitina (KUBELKA et al., 2000; LONERGAN et al., 2000; MERMILLOD et al., 2000; ADONA; LEAL, 2004), ou por inibidores não específicos de síntese protéica como

ciclohexamida (MEINECKE et al., 2001), ou fosforilação protéica como a 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) (SAEKI et al., 1997; AVERY et al., 1998; ANDERIESZ et al., 2000; DODE; ADONA, 2001).

A BLI é uma purina derivada de micélios de *Aspergillus sp* (MOTLIK et al., 1998). Esta inibe proteínas CDKs importantes na progressão do ciclo celular (SCHIMMEL et al., 1998; SCHANG, 2004) além de comportar-se como um inibidor competitivo pelo local de ligação do ATP na CDK1 (SAX et al., 2002). A BLI merece destaque com bloqueador da meiose devido à sua ação específica na regulação do ciclo celular, sem impedir a transcrição, síntese protéica ou a fosforilação, ao contrário de outras drogas como a 6-DMAP e a ciclohexamida (DONNAY et al., 2004). Desta forma, é possível bloquear oócitos bovinos em estádio de vesícula germinativa *in vitro* por um determinado período com o uso desse inibidor.

A pré-maturação *in vitro* de oócitos bovinos mediante o uso de BLI não prejudica o desenvolvimento embrionário (PONDERATO et al., 2002; ADONA; LEAL, 2004; COY et al., 2005). Porém, é importante destacar que somente a prématuração não "capacita" o oócito, mas é uma alternativa para a suplementação dos meios.

A utilização de diferentes substâncias poderia proporcionar um ambiente *in vitro* mais adequado para "capacitação" do oócito, possibilitando, desta maneira, uma maturação mais competente após o bloqueio resultando em um aumento na produção de embriões *in vitro*.

A pré-maturação dos oócitos é não somente uma alternativa para a suplementação dos meios na tentativa de aumentar a taxa de embriões, mas também, uma opção a ser utilizada nas rotinas de aspiração *in vivo* de oócitos, onde profissionais precisam transportá-los por períodos prolongados até o local onde será

realizado a PIV de embriões (HASHIMOTO et al., 2003). Neste caso, o horário dos procedimentos de PIV pode ser pré-definido, proporcionando uma rotina mais consistente nos laboratórios de PIV. Na transferência de núcleo, por sua vez, a prématuração pode contribuir positivamente na relação eficiência/custo do procedimento. A pré-maturação, nesse caso, pode proporcionar um maior número de oócitos manipulados gerados de um mesmo "pool" de oócitos, reduzindo custos por aumentar a produção embrionária em relação à coleta de ovários e aumentando a homogeneidade dos oócitos a serem reconstruídos nos experimentos, uma vez que somente um número pequeno de oócitos pode ser manipulado por rotina de clonagem.

#### 3.4 FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO

Neurotrofinas pertencem a uma família de fatores de crescimento polipeptídicos amplamente solúveis reconhecidos pelos papéis que desempenham no sistema nervoso dos mamíferos, sendo essenciais para a diferenciação e sobrevivência de diversos nervos do sistema nervoso central e periférico (SNIDER, 1994; DAVIES, 2000).

Embora originalmente descobertos no sistema nervoso, muitos membros dessa família são expressos em outros sistemas, tais como: sistema cardiovascular, imune, endócrino e reprodutor (YAMAMOTO et al., 1996; TESSAROLLO, 1998). As neurotrofinas incluem o fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e neurotrofina-3 (NT3).

Foi constatado que os membros da família das neurotrofinas (NGF, BDNF, NT-4/5, NT-3) e seus respectivos receptores (TrkA para NGF, Trk B para BDNF e NT-4/5 e TrkC para NT-3) são expressos nos ovários dos mamíferos (DISSEN et al., 1996). Além disso, estas substâncias ainda desempenham a função de estimular a secreção de esteróides (WARAKSA et al., 1995), o desenvolvimento folicular (OJEDA et al., 2000) e a ovulação (SEIFER et al., 2002a).

O BDNF é um exemplo de neurotrofina secretada pelas células do *cumulus* e que também está associada com o aumento do AMPc (SEIFER et al., 2002a). Isto sugere que o BDNF produzido pelas células da granulosa está envolvido na maturação do oócito e a produção de BDNF pode ser estimulada na presença de gonadotrofinas (MARTINS DA SILVA et al., 2005).

Em estudos com camundongos foi demonstrado que o oócito possui receptor para o BDNF e que *in vivo*, oócitos sem o receptor suprimem a extrusão do 1°CP (KAWAMURA et al., 2005).

Kawamura et al. (2005) ainda demonstram que o BDNF produzido pelas células do *cumulus*, além de proporcionar o aumento da extrusão do 1℃P, aumenta a competência de desenvolvimento pré-implantação de oócitos de camundongos *in vivo* e *in vitro*. Martins da Silva et al. (2005) também constataram um maior desenvolvimento pré-implantação dos embriões produzidos a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* na presença de BDNF. Em adição, o aumento dos níveis de BDNF no útero antes do período pré-implantacional e a exclusiva expressão do receptor Trk B nas células do trofectoderma, sugerem uma função paracrina do BDNF durante a implantação do blastocisto (KAWAMURA et al.,2007; 2009).

Martins da Silva et al. (2005) e Kawamura et al. (2005) ainda sugerem que é necessário avaliar somente a capacidade de desenvolvimento citoplasmático desses

oócitos para medir a real participação e capacidade do citoplasma, assim, uma boa forma de realizar essa mensuração é através da ativação partenogenética e da transferência de nucleo (DE SOUSA et al., 2002; LIU; AOKI, 2002), pois estas técnicas demonstram a real participação e capacidade do citoplasma sobre o posterior desenvolvimento embrionário.

#### 3.5 ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

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

A maioria dos oócitos de mamíferos é ovulada em MII e permanece nesta fase até serem fecundados e ativados pelo espermatozóide. Com a fecundação, ocorre a finalização dos processos da meiose e o início do desenvolvimento embrionário, através de uma série de eventos intracelulares num processo denominado ativação oocitária.

O espermatozóide é o ativador natural do oócito. Após a fusão do espermatozóide com oócito ocorre o desencadeamento de uma cascata de eventos que culmina com a formação do inositol trifosfato (IP3) que desempenha a função de estimular a liberação de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) no interior do oócito (HAJNOCZKY et al., 2003).

Com as oscilações intracelulares de Ca<sup>2+</sup> inicia-se uma série de eventos no interior do oócito que são imprescindíveis para o posterior desenvolvimento

embrionário, tais como: diminuição da atividade do MPF e da MAPK, exocitose dos grânulos corticais, endurecimento da zona pelúcida, bloqueio da polispermia, retomada da meiose, extrusão do segundo corpúsculo polar, formação dos prónúcleos e início das mitoses (WHITE e YUE, 1996; KUPKER et al., 1998).

In vitro, é possível induzir artificialmente a ativação do oócito aumentando os níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> através de agentes físicos, como eletrochoques e injeção intracelular de CaCl<sub>2</sub>, ou através de agente químicos, como ionomicina, etanol, ciclohexamida, estrôncio e 6-dimetilaminopurina (NUSSBAUM; PRATHER, 1995; BOS-MIKICH et al., 1997; DE LA FUENTE; KING, 1998; LOI et al., 1998).

A ativação partenogenética é uma valiosa ferramenta para avaliar o real potencial de desenvolvimento citoplasmático do oócito, pois não há interferência de fatores ligados ao espermatozóide (DE SOUSA et al., 2002; LIU; AOKI, 2002). Além disso, na transferência de núcleo, a ativação partenogenética torna-se indispensável tendo em vista que o núcleo da célula doadora de material genético não é capaz de ativar o citoplasma do oócito receptor (CZOLOWSKA et al., 1984; SZOLLOSI et al., 1986).

#### 3.6 TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO

Através da transferência de núcleo de uma célula para o citoplasma enucleado de um oócito receptor é possível produzir um animal geneticamente igual ao da célula doadora do material genético. Isto foi inicialmente sugerido na década

de 50, quando a partir desta metodologia, obtiveram um animal (rã) clonado (KEEFER, 2008).

A partir desta idéia inicial, dois princípios iniciais surgiram: 1) a existência de conservação do genoma depois da diferenciação nuclear e 2) a extraordinária capacidade de reprogramação do citoplasma do oócito (GURDON; BYRNE, 2003).

O primeiro animal clonado nascido (ovelha) com a utilização de células embrionárias ocorreu em 1986 (WILLADSEN, 1986). Em seguida, o sucesso foi alcançado por outros pesquisadores e em outras espécies tais como: bovinos (PRATHER et al., 1987; SIMS; FIRST, 1994), coelhos (STICE; ROBL, 1988), suínos (PRATHER et al., 1989), camundongos (CHEONG et al., 1993) e macacos (MENG et al., 1997).

Em 1997, Wilmut relatou o nascimento do primeiro mamífero (a ovelha "Dolly") gerado por clonagem através de uma célula somática adulta e, a partir de então, a transferência de núcleo com células somáticas (TNCS) vem sendo bem sucedida e utilizada em várias espécies de mamíferos, tais como: ovelhas, bovinos, camundongos, cabras, porcos, gatos, coelhos, ratos, mulas e cavalos (CAMPBELL et al., 1996; WILMUT et al., 1997; CIBELLI et al., 1998; KATO et al., 1998; WAKAYAMA et al., 1998; BAGUISI et al., 1999; WAKAYAMA; YANAGIMACHI, 1999; POLEJAEVA et al., 2000; CHESNE et al., 2002; SHIN et al., 2002; GALLI et al., 2003; WOODS et al., 2003; ZHOU et al., 2003).

A clonagem foi, e hoje em dia ainda é, o alvo de vários pesquisadores, pois esta técnica pode contribuir de forma benéfica para diversos fatores, tais como: controle da biodiversidade (WELLS et al., 1998), transferência de núcleo interespecífica (DINDOT et al., 2004), utilização de animais biorreatores (HOUDEBINE,

2000), modelo de pesquisa, clonagem comercial (GALLI et al., 1999; FABER et al., 2003) (PATERSON et al., 2003), dentre outros.

Atualmente, mesmo com o sucesso na clonagem sua eficiência ainda é muito baixa e as taxas embrionárias estão em torno de 23% (YANG et al., 2006) e a porcentagem de animais nascidos é ainda menor (<5-11%) (GALLI et al., 1999; FLETCHER et al., 2007; KEEFER, 2008).

As ineficiências *in vitro* relacionadas à TN são atribuídas a diversos fatores, muitos desses ainda não muito compreendidos, tais como: o estágio do ciclo celular da célula doadora de núcleo (COLLAS et al., 1992; KEEFER, 2008), incompleta ou ineficiente reprogramação nuclear após a clonagem (STICE et al., 1996), interações entre a célula doadora de núcleo e o citoplasma do oócito receptor (CAMPBELL et al., 1996) anormalidades fetais (CHAVATTE-PALMER et al., 2004) placentárias (HASHIZUME et al., 2002; LEE et al., 2004). Desde o momento em que os embriões são transferidos até os 90 dias de gestação, cerca de 80% das prenhezes obtidas por transferência de núcleo são perdidas (HILL;BURGHARDT et al., 2000). O maior problema associado com a mortalidade de animais clonados é o inadequado desenvolvimento placentário desses embriões (HILL;BURGHARDT et al., 2000; HILL;WINGER et al., 2000; DE SOUSA et al., 2001; ONO et al., 2001; OGURA et al., 2002).

Este problema é observado com maior freqüência durante os estágios iniciais do desenvolvimento pós-implantação. Neste período, 45-55 dias de gestação, há redução da vascularização e menor tamanho dos placentônios (HILL;WINGER et al., 2000). Aos 60 dias, há uma perda da viabilidade fetal e menor número de placentônios se comparados com prenhezes obtidas a partir de inseminação artificial (HASHIZUME et al., 2002).

Em geral, algumas das mais comuns anormalidades observadas *in vivo* em bovinos são: a redução do número de placentônios, placentônios aumentados, pior desenvolvimento vascular, hidroalantóides e aumento de peso das membranas fetais nos estágios mais avançados de gestação (WELLS et al., 1999; HILL;WINGER et al., 2000; HASHIZUME et al., 2002).

Mesmo a transferência de núcleo sendo rotineiramente desenvolvida por décadas e por pesquisadores de vários laboratórios ao redor do mundo, nem todas as questões referente ao desenvolvimento de um indivíduo clonado estão claramente definidas. Certamente os problemas relacionados à clonagem não são decorrentes somente dos aspectos *in vivo* acima relatados, mas sim de uma somatória de fatores, principalmente dos *in vitro*.

Por exemplo, porque células isoladas ao mesmo tempo de um mesmo tecido e de um mesmo indivíduo possuem diferentes eficiência na clonagem? Nós podemos produzir uma célula doadora de núcleo mais suscetível à reprogramação? E a questão mais importante, quais são os genes presentes no oócitos responsáveis pela reprogramação do núcleo somático? (CIBELLI, 2007). Alterações epigenéticas no DNA que alteram a expressão dos genes é um processo freqüentemente relatado em embriões derivados por transferência de núcleo (NIEMANN et al., 2002; SEBASTIANO et al., 2005).

Essas alterações não ocorrem de uma só vez, ocorrem logo após o início da embriogênese e continuam durante o desenvolvimento embrionário antes do embrião ser implantado no útero e podem ocorrer até em estágios mais avançados do desenvolvimento (CIBELLI, 2007).

Desta forma, acredita-se que os embriões clonados aparentemente saudáveis certamente possuem incompleta ou ineficiente reprogramação nuclear, e que esta

seja a causa principal dos altos níveis de perdas gestacionais ou anomalias nos animais clonados (JOUNEAU; RENARD, 2003; LATHAM, 2004).



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

# 4.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

## 4.2 COLETA DE OVÁRIOS E OÓCITOS

Ovários bovinos foram coletados em frigorífico logo após o abate e transportados em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) acrescida de antibióticos (100 Ul/mL de penicilina e 100 Ul/mL de estreptomicina) à temperatura de 35° C. No laboratório, os ovários foram lavados com a mesma solução e os folículos com diâmetro de 2 - 6 mm foram aspirados com auxílio de uma agulha 18 "G" acopladas a seringas estéreis e descartáveis de 10 mL. O líquido folicular recuperado foi depositado em tubos cônicos de 50 mL e mantido em repouso por 5 minutos para decantação. A porção superior foi retirada e o precipitado foi transferido para placas de *Petri* (60 mm) onde se realizou a busca dos oócitos sob microscópio estereoscópico. Foram utilizados no experimento oócitos considerados como grau I (GI), contendo mais de 3 camadas de células do *cumulus* compactas e citoplasma

homogêneo e oócitos grau II (GII), contendo de 2 a 3 camadas de células do cumulus compactas e citoplasma homogêneo.

# 4.3 MATURAÇÃO IN VITRO

Os oócitos foram cultivados em meio de maturação [TCM199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 5,0 μg/mL de hormônio luteinizante (LH), 0,5 μg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 0,2 mM de piruvato e 10 μg/mL de gentamicina]. O cultivo da MIV foi realizado em gotas de 100 μL de meio de maturação (15 oócitos por gota), sob óleo mineral a 38,5° C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

# 4.4 PRÉ-MATURAÇÃO

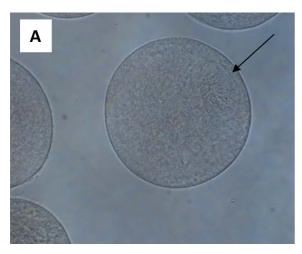
O inibidor BLI foi preparado em solução estoque de 50 mM em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) e armazenado em freezer a – 20°C. Para a prématuração os oócitos bovinos foram cultivados *in vitro* por 24 horas com BLI diluída em meio B199 (TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato e 10 μg/mL de gentamicina) na concentração final de 10 μM de BLI. O cultivo de pré-maturação foi realizado em gotas de 100 μL de meio de bloqueio (15 oócitos por gota), sob óleo mineral a 38,5° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

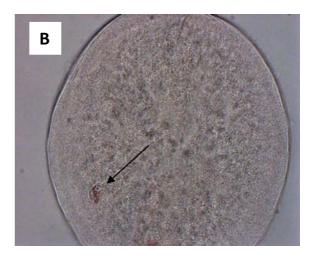
# 4.5 FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO

O BDNF foi diluído em meio B199 aliquotado e posteriormente armazenado em freezer – 20℃ até o momento do uso. A concentra ção final utilizada foi de 10ng/mL. Oócitos bovinos foram pré-maturados e maturados na presença e na ausência do BDNF.

# 4.6 AVALIAÇÃO DA TAXA DE MATURAÇÃO

Após 24 horas de maturação os oócitos bloqueados e/ou maturados foram desnudados com hialuronidase 0,2% em tampão fosfato salino (PBS) livre de Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup> com auxílio de um *vortex* por 3 minutos. Os oócitos foram lavados três vezes em PBS e após a lavagem foram montados entre lâmina e lamínula para a fixação em etanol e ácido acético (3:1) por 24 horas. Os oócitos foram corados com lacmóide 0,04% por aproximadamente 5 minutos para avaliação da taxa de maturação em microscópio óptico. Os oócitos que apresentaram a VG foram considerados imaturos e os oócitos que possuíam o 1°CP foram considerados em fase de MII (maturados).





**Figura 1** - Imagem referente a oócitos em diferentes fases de maturação. (A) Oócito do grupo controle, seta demonstra a vesícula germinativa (VG), indicativo que o oócito colocado para o bloqueio e/ou maturação apresentava-se imaturo, aumento 20X. (B) Oócito após ser pré-maturado e/ou maturado, seta indica presença do 1℃P, indicativo que o mesmo encontra-se em fase de metáfase (MII), aumento 40X.

# 4.7 ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

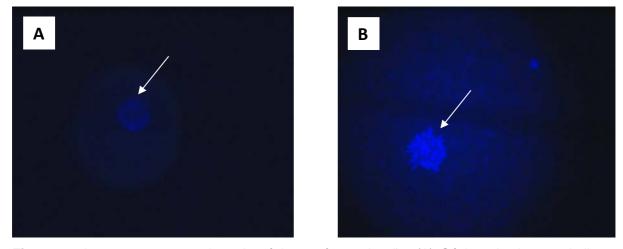
Após a pré-maturação e/ou a MIV, os oócitos foram desnudados com 0,2% de hialuronidase em PBS livre de Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup> com auxílio de um pipetador. Os oócitos que apresentaram extrusão do 1º corpúsculo polar foram usados para ativação partenogenética.

A ativação foi realizada com meio H199 (TCM-199 com 25mM Hepes) suplementado com 0,5 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) e 5 μM de ionomicina por 5 minutos. Ao término da incubação os oócitos foram lavados em H199 saturado com 30 mg/mL de BSA, seguido de cultivo em fluido de oviduto sintético (SOF) suplementado com 5 mg/mL de BSA, 2,5% SFB, 0,2 mM de piruvato, 10 μg/mL de gentamicina e 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) por 3 horas. Após os procedimentos de ativação, os oócitos foram lavados e cultivados *in vitro* (CIV) em gotas de 100 μL de meio SOF (livre de 6-DMAP) sob óleo mineral a 38,5°C

e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Um grupo de oócitos foi cultivado separadamente por 15-16h para avaliação de taxa de pró-núcleo (ativação) e o restante foi cultivados até o 8° dia para avaliação de produção de blastocisto.

# 4.8 AVALIAÇÃO DA TAXA DE FORMAÇÃO DE PRÓ-NÚCLEO

Após 15-16h do início da ativação os oócitos foram fixados em 3% de paraformaldeído em PBS/PVP (1 mg/mL de álcool polivinílico) por 1 hora, depois foram corados com Hoescht 33342 (10 μL/mL) por 10 minutos e montados entre lâmina e lamínula com glicerol para avaliação em microscópio de fluorescência. Foram considerados ativados os oócitos que apresentaram 1 ou mais pró-núcleos.



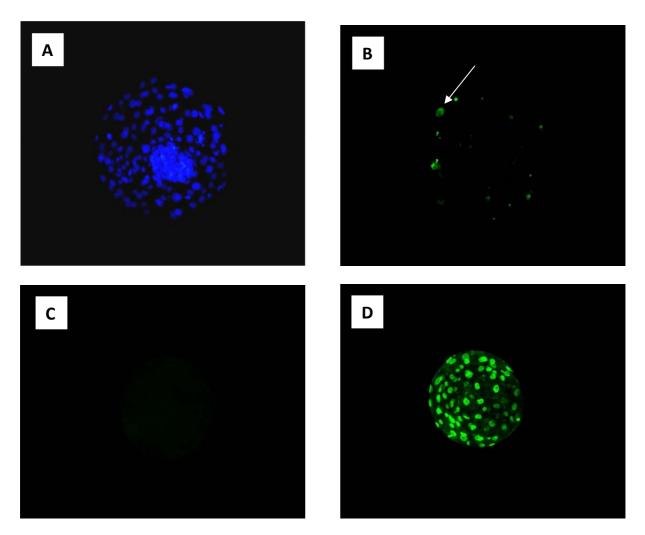
**Figura 2 -** Imagens representativas de oócitos após a ativação. (A) Oócito ativado, seta indica a presença de pró-núcleo, aumento 20X. (B) Oócito não ativado, seta indica presença de metáfase, aumento 40x.

# 4.9 AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA DOS EMBRIÕES

A técnica de TUNEL (do inglês, *Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling*) identifica *in situ* a fragmentação internucleossômica do DNA. Esta avaliação foi realizada com o "In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein" (Roche) sequindo as recomendações do fabricante.

Os embriões foram lavados em PBS/PVP e fixados por 1 hora em PBS com 3% de paraformaldeído; permeabilizados por 1 hora em PBS com 0,5% de Triton X-100 e 0,1% de citrato de sódio e lavados em PBS/PVP. Os embriões foram distribuídos em controle negativo, controle positivo e amostras. O controle positivo foi tratado com DNAse (600 µL de água ultra pura mais 400 µM Tris-HCI, 50 mM de MgCl<sub>2</sub> e 50 UI/mI de DNAse) por 1 hora a 37°C. Após a lavagem os embriões em PBS/PVP, o controle positivo e as amostras foram incubados com 10% de solução enzimática e 90% de solução marcadora por 1 hora a 37°C no escuro em câmera úmida. O controle negativo foi incubado apenas com solução marcadora na ausência da solução enzimática para conferir a marcação.

Os embriões do controle negativo, controle positivo e amostras foram incubados com 10 µg/mL de Hoescht 33342 por 10 minutos. Após este procedimento foram montados em lâminas com glicerol (15µL) e analisadas em microscópio de fluorescência.



**Figura 3 -** Imagens digitalizadas representativas dos blastocistos ativados submetidos à técnica de TUNEL para avaliação da fragmentação do DNA. (A) Blastocisto corado com Hoescht 33342 para contagem do número total de células; a seta indica uma célula. (B) Mesmo blastocisto, avaliado em relação à fragmentação de DNA; a seta indica uma célula com fragmentação. (C) Blastocisto do grupo controle negativo, com ausência de células com fragmentação de DNA. (D) Blastocisto do grupo controle positivo, onde todas as células foram fragmentadas com DNAse. Todas as fotos foram tiradas com aumento de 20x.

# 4.10 ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM CELULAR DOADORA DE NÚCLEO

Para o estabelecimento da cultura celular, uma amostra de tecido (pele) com aproximadamente 3 mm² foi coletada dos animais a serem clonados (bovinos). A amostra foi lavada em PBS acrescido de antibióticos (100 Ul/mL de penicilina e 100

Ul/mL de estreptomicina) e o tecido coletado foi transportado até o laboratório a 4°C para o devido processamento. No laboratório a amostra do tecido foi dividida em fragmentos menores que foram depositados no fundo de placas de *Petri* (35 mm). Em seguida foram adicionados 500 μL de meio de cultivo celular (DMEM suplementado com 20% de SFB, 2 mM de piruvato, 50 μg/mL de glutamina e 50 μg/mL de gentamicina).

Após a agregação das células (fibroblastos) no fundo da placa, as amostras de tecidos foram removidas e o meio substituído por DMEM suplementado com 10% de SFB até atingirem a confluência.

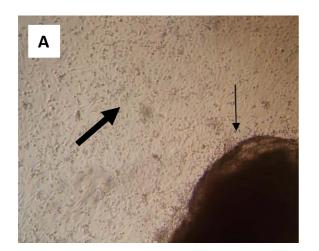
# 4.11 ANÁLISE CROMOSSÔMICA DA LINHAGEM CELULAR POR CITOGENÉTICA

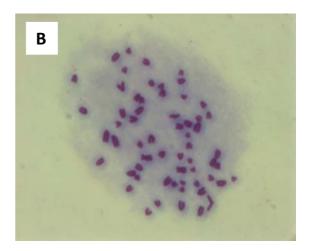
Após a definição e estabelecimento da linhagem celular a ser utilizada nos experimentos de TN foi realizada a avaliação da viabilidade genética da cultura celular. As células foram cultivadas até a 2ª passagem momento que foi realizada a técnica de citogenética segundo protocolo previamente estabelecido no laboratório.

Foram adicionados à cultura 70μL de colchicina (16μg/mL, Nutricell®) para bloquear o ciclo celular e após uma hora as células foram lavadas com PBS sem Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup> e desagregadas com a utilização de tripsina 0,25%. As células foram recuperadas em tubos cônicos de 15mL, centrifugadas e o *pellet* foi ressuspendido em 5mL de solução hipotônica de 0,075M de KCl por 20 minutos.

Após esse período adicionou-se 2mL de fixador (metanol e ácido acético 3:1) para bloqueio da hipotonização e as células foram centrifugadas novamente. O pellet foi novamente ressuspendido em 5mL de fixador e mantido no mesmo por 30 minutos e após esse período foram montadas as lâminas coradas com Giemsa 4%.

A análise citogenética foi realizada sob microscópio óptico em aumento de 100x e foram contados os cromossomos de 20 metáfases celulares para a determinação da viabilidade das células cultivadas.





**Figura 4 -** Imagem referente ao cultivo *in vitro* e citogenética. (A) estabelecimento da linhagem celular doadora de núcleo, seta fina mostra um fragmento de tecido da pele e seta grossa demonstra fibroblastos aderidos no fundo da placa de Petri, aumento 10X. (B) uma metáfase da cultura com normalidade cromossômica (n=60), aumento 100X.

# 4.12 CONGELAÇÃO DOS FIBROBLASTOS PARA CLONAGEM

Após a 2ª passagem celular as células foram desagregados das placas de Petri com o uso de tripsina 0,25%. A inativação da tripsina foi realizada com meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 0,2 mM de piruvato, 50 μg/mL de glutamina e 50 μg/mL de gentamicina durante a centrifugação da amostra a 200g por 10 minutos.

Após a retirada do sobrenadante, o precipitado resultante foi ressuspendido em 1 mL de meio DMEM suplementado com 20% de SFB, 10% de dimetilsufóxido (DMSO), 0,2 mM de piruvato, 50 μg/mL de glutamina e os fibroblastos foram congelados no mesmo meio a uma concentração final de 1 x 10<sup>6</sup> células/mL.

Os criotubos com os fibroblastos foram mantidos em um container (NALGENE™) por 4 horas a −86°C e após esse período foram armazenados em botijões de nitrogênio líquido.

# 4.13 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA A TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO

Para a realização da TN com células somáticas (fibroblastos), cinco dias antes do dia programado para a TN, um criotubo foi descongelado a 37º e foram preparados a partir dele dois cultivos celulares em placas de cultivo de 35 mm. O meio contendo as células foi recuperado em um tubo cônico para a lavagem e retirada do DMSO. Para 1 mL de meio acrescido de DMSO, foi utilizado o dobro de meio DMEM com 10% de SFB. Após a centrifugação, o precipitado celular foi homogeneizado e dividido entre as placas de cultivo. Foram utilizados dois cultivos celulares para a TN, sendo uma placa utilizada para o grupo controle e a outra para o grupo experimental de oócitos pré-maturados, visto que foram duas manipulações separadas.

# 4.14 TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO

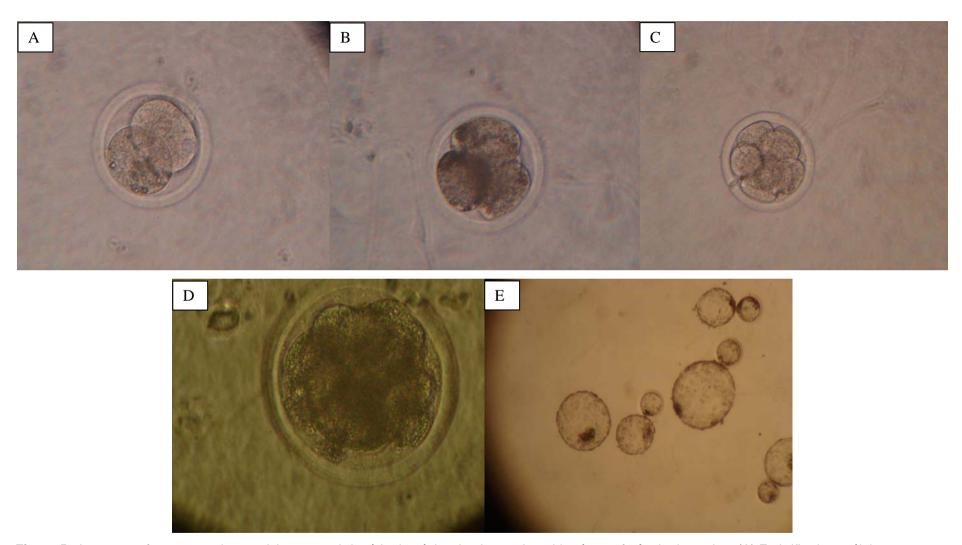
Após 18 horas após a maturação, foi realizada remoção das células do cumulus com 0,2% de hialuronidase e agitação mecânica com auxílio de micropipetador. O oócitos que apresentaram o 1°corp úsculo polar (CP) foram incubados por 15 minutos em meio SOF suplementado com 7,5 μg/mL de citocalasina B e 5 μg/mL de Hoescht 33342 em estufa de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, os oócitos foram transferidos para a gota de micromanipulação contendo H-SOF com 10% SFB, 2 mM de piruvato, 50 μg/mL de gentamicina e 10 mM de Hepes sódico e ácido. Com o auxílio de micropipetas montadas em um micromanipulador, às 20 horas do início da MIV os oócitos foram enucleados um a um pela aspiração do 1°CP e da placa metafásica com aproximadamente 15% do citoplasma adjacente.

Em seguida, os fibroblastos foram desagregados da placa com tripsina e foram aspirados um a um para o interior da micropipeta de injeção e inseridos (1 fibroblasto por oócito) no espaço perivitelínico do oócito. Para reconstrução embrionária os oócitos com a célula somática, foram mantidos durante 3 minutos em solução de manitol (0,3M). Em seguida, foram transferidos para a câmara de fusão com manitol, posicionados entre dois eletrodos paralelos de platina (200 μm de distância) e foram submetidos a uma descarga elétrica de 1KV/cm de corrente contínua durante 5 segundos, seguida de duas descargas elétricas de 1,75KV/cm por 65μs para promover a fusão das membranas do oócito e da célula somática.

Os oócitos foram então incubados novamente em meio SOF e foram avaliados quanto à fusão uma hora após o início da fusão. Os oócitos fundidos foram mantidos em meio SOF até o momento da ativação partenogenética 6 horas

após terem sidos removidos da MIV, completando assim, 26 horas de MIV antes da ativação. Posteriormente à ativação, os embriões foram transferidos para gotas de 100μL de meio de cultivo (SOF) e foram co-cultivados com mono camada de células do *cumulus* a 38,5℃ em atmosfera de 5% de CO <sub>2</sub> em ar.

No segundo dia de cultivo D2 foi avaliada a taxa de clivagem. No sétimo e oitavo dia de cultivo (D7 e D8) foi avaliada a produção de blastocisto e do total de embriões produzidos no D8, quinze embriões de cada grupo (MIV e BL/BD) foram fixados em PBS com 3% de paraformaldeído para avaliação do número total de células e da fragmentação de DNA.



**Figura 5 -** Imagens referentes ao desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos submetidos à transferência de nucleo. (A) Embrião duas células. (B) Embrião quatro células. (C) Embrião oito células. (D) Mórula. (E) Blastocisto com sete dias.

## 4.15 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

No sétimo dia de cultivo *in vitro*, os embriões que atingiram o estádio de blastocisto foram envasados (28 embriões do grupo MIV e 26 embriões do grupo BL/BD) em palhetas de 0,25 mL (1 embrião por palheta) em meio H-SOF contendo 5 mg/mL de BSA e transferidos para receptoras previamente sincronizadas para o estabelecimento de gestações. Para a realização deste, as fêmeas foram submetidas à anestesia epidural caudal, cerca de 10 min antes, sendo aplicados 6 mL de lidocaína a 2%.

# 4.16 ACOMPANHAMENTO DAS GESTAÇÕES

As receptoras que receberam os embriões clonados foram submetidas ao exame ultra-sonográfico transretal no 30° e no 60° dia de gestação utilizando-se uma eco-câmera portátil, modo de exibição da imagem B em tempo real (Aloka SSD-500V, Aloka Co. Tóquio, Japão) e um transdutor linear de 5 MHz de freqüência. As fêmeas com diagnóstico de prenhez positivo após o 60° dia foram separadas das demais para o acompanhamento do desenvolvimento a termo dos animais clonados.

# 4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o programa BioEstat 4.0. Para as avaliações de taxa de maturação, formação de pró-núcleo, produção de embrionária por partenogênese e transferência de núcleo e taxa de gestação as 30, 60, 90 e 120 dias, foi aplicado do teste Qui-quadrado a 5% de significância. Para a avaliação da qualidade embrionária (média de células e IDA) foi realizada a análise de variância (ANOVA) a 5% de significância.

5 RESULTADOS

#### **5 RESULTADOS**

5.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA TAXA DE MATURAÇÃO, FORMAÇÃO DE PRÓ-NÚCLEO E DESENVOLVIMENTO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA DE OÓCITOS SUPLEMENTADOS OU NÃO COM BDNF DURANTE A MATURAÇÃO IN VITRO

#### 5.1.1 TAXA DE MATURAÇÃO

Não foi encontrada diferença (P>0,05) entre os grupos submetidos à maturação *in vitro* com BDNF (MIV/BDNF; 78,6%) ou sem BDNF (MIV; 77,6%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Maturação nuclear de oócitos maturados in vitro com ou sem BDNF

	_	Estádio da meiose					
Grupo	N° oócitos	VG	MI	Al	TI	Sem ID	MII n (%)
Controle	47	44	0	0	0	3	0,0
MIV	98	1	12	0	7	2	76 (77,5%)
MIV/BD	98	2	9	1	3	6	77 (78,6%)

Grupos: MIV: maturação *in vitro* por 24h; MIV/BD: maturação *in vitro* por 24h com suplementação de BDNF. Estádios: vesícula germinativa (VG), anáfase I (AI), metáfase I (MI), telófase I (TI), metáfase II (MII). Sem ID: sem identificação. Resultados referentes a três repetições.

#### 5.1.2 TAXA DE FORMAÇÃO DE PRÓ-NÚCLEO

Nos grupos somente maturados (Tabela 2), observou-se a redução na formação de pró-núcleo quando o meio foi suplementado MIV/BDNF (71,4%) em relação ao grupo não suplementado MIV (91,1%) (P<0,05).

**Tabela 2 -** Taxa de formação de pró-núcleo de oócitos maturados com ou sem BDNF

		Formação de pró-núcleo				
Grupo	N°oócitos	+	-			
		n (%)	N			
MIV	45	41 (91,1) <sup>a</sup>	4			
MIV/BD	42	30 (71,4) <sup>b</sup>	12			

Grupos: MIV; maturação *in vitro* por 24h; MIV/BD; maturação *in vitro* por 24h com suplementação de BDNF. Aproximadamente 16 horas após a ativação os oócitos dos dois grupos foram retirados do cultivo e fixados para posterior análise da formação de prónúcleo. a-b Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (P<0,05). Resultados referentes a três repetições.

# 5.1.3 DESENVOLVIMENTO IN VITRO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA DE OÓCITOS SUBMETIDOS À ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

A inclusão do BDNF durante a MIV não teve efeito (P>0,05) sobre os parâmetros avaliados tais como, extrusão do 1℃P (5 9,6 e 62,1% para MIV e MIV/BD, respectivamente), clivagem (78,7 e 80,7% para MIV e MIV/BD, respectivamente), produção de blastocisto no sétimo (47,0 e 48,0% para MIV e MIV/BD, respectivamente) e oitavo dia de cultivo (46,0 e 46,2% para MIV e MIV/BD,

respectivamente) e embriões eclodidos (28,5 e 38,1% para MIV e MIV/BD, respectivamente) também no oitavo dia (Tabela 3).

Também foi realizada a avaliação da fragmentação de DNA dos embriões produzidos por partenogênese. Os embriões produzidos nos grupos MIV (n=9) e MIV/BD (n=11) foram avaliados com relação ao número médio de células e índice de apoptose (IDA). Não foi observada diferença (P>0,05) para os parâmetros avaliados entre os tratamentos MIV (177 células; 0,0319 de IDA) e MIV/BDNF (183 células; 0,0387 de IDA) (Tabela 4).

**Tabela 3-** Desenvolvimento embrionário de oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado ou não com BDNF e submetidos à ativação partenogenética.

#### Desenvolvimento embrionário

Grupo	<b>N°oócitos</b>	1°CP	D2	D7	D8	Ec.D8
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
MIV	465	277 (59,5)	218 (78,7)	130 (46,9)	127 (45,8)	37 (28,4)
MIV/BD	467	290 (62,1)	234 (80,7)	139 (47,9)	134 (46,2)	51 (38,0

<sup>1°</sup>CP, 1° corpúsculo polar; D2, clivagem no 2° dia; D7, blastocisto no 7° dia; D8, blastocisto no 8°dia; Ec.D8, blastocistos eclodidos no 8°dia. Grupos: MIV: maturação *in vitro* por 24h; MIV/BD: maturação in vitro por 24h com suplementação de BDNF. A taxa de 1°CP foi calculada s obre o total de oócitos. As taxas de D2, D7 e D8 foram calculadas sobre os oócitos que extruíram o 1°CP. A taxa de Ec.D8 foi calculada s obre blastocisto no D7. Resultados referentes a cinco repetições.

**Tabela 4 -** Fragmentação de DNA dos embriões produzidos *in vitro* após ativação partenogenética de oócitos maturados na ausência ou presença de BDNF.

Grupo	Embriões N	Média de células M ± EP	Células TUNEL + n	Índice de apoptose IDA ± EP
MIV	9	177±17,5	51	0,0319±0,008
MIV/BD	11	183±22,7	78	0,0387±0,015

MIV: maturação *in vitro* por 24h; MIV/BD: maturação *in vitro* por 24h com suplementação de BDNF. Número médio de células (M) e índice de apoptose (IDA). EP(±): erro padrão.

5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA TAXA DE MATURAÇÃO, FORMAÇÃO DE PRÓ-NÚCLEO E DESENVOLVIMENTO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA DE OÓCITOS SUPLEMENTADOS OU NÃO COM BDNF DURANTE À PRÉ-MATURAÇÃO SEGUIDO DE MATURAÇÃO SEM BDNF.

## 5.2.1 TAXA DE MATURAÇÃO

Nos grupos submetidos na pré-maturação observou-se um aumento (P<0,05) da maturação oocitária quando o meio foi suplementado com BDNF (BL = 76,7% e BL/BDNF = 91,2%) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Maturação nuclear de oócitos pré-maturados com ou sem BDNF, seguido de maturação *in vitro* sem BDNF

	_	Estádio da meiose					
Grupo	N°oócitos	VG	MI	Al	TI	Sem ID	MII n (%)
Controle	47	44	0	0	0	3	0,0
BL	86	0	12	0	4	4	66 (76,7%) <sup>a</sup>
BL/BD	80	0	2	1	1	3	73 (91,2%) <sup>b</sup>

Grupos: BL, pré-maturação por 24h e posterior maturação *in vitro* por 24h; BL/BD; pré-maturação por 24h com suplementação de BNDF e posterior maturação *in vitro* por 24h. Estádios: vesícula germinativa (VG), anáfase I (AI), metáfase I (MI), telófase I (TI), metáfase II (MII). Sem ID: sem identificação. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (P<0,05). Resultados de três repetições.

### 5.2.2 TAXA DE FORMAÇÃO DE PRÓ-NÚCLEO

Os grupos submetidos a pré-maturação com ou sem BDNF (BL = 77,5% e BL/BD = 64,1%) apresentaram taxas de ativação similares (P>0,05) (Tabela 6).

14

**Tabela 6 -** Taxa de formação de pró-núcleo de oócitos pré-maturados com ou sem BDNF seguido de maturação *in vitro* sem BDNF

BL/BD

39

 Grupo N°oócitos
 Formação de pró-núcleo

 +

 n (%)
 n

 BL 40 31(77,5)
 9

25(64,1)

Grupos: BL; pré-maturação por 24h e posterior maturação *in vitro* por 24h; BL/BD; pré-maturação por 24h com suplementação de BNDF e posterior maturação *in vitro* por 24h. Aproximadamente 16 horas após a ativação os oócitos dos dois grupos foram retirados do cultivo e fixados para posterior análise da formação de pró-núcleo. Resultados referentes a três repetições.

5.2.3 DESENVOLVIMENTO IN VITRO E QUALIDADE EMBRONÁRIA DE OÓCITOS SUBMETIDOS À ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

O grupo pré-maturado suplementado com BDNF (65,2%) apresentou maior taxa de clivagem (P<0,05) se comparado com grupo não suplementado (57,7%). Porém, para os outros parâmetros avaliados tais como extrusão do 1℃P (73,3 e 75,6% para BL/BD e BL, respectivamente) produção de blastocisto no sétimo (35,5 e 41,4% para BL/BD e BL, respectivamente) e oitavo (36,1 e 41,1% para BL/BD e BL, respectivamente) dia de cultivo e embriões eclodidos (33,0 e 37,5% para BL/BD e BL, respectivamente) também no oitavo dia, não foram encontradas diferenças (P>0,05) (Tabela 7).

Também foi realizada a avaliação da fragmentação de DNA dos embriões produzidos. Os embriões produzidos dos grupos BL (n=10) e BL/BD (n=10), foram avaliados quanto ao número médio de células e ao IDA. Não foi observada diferença (P>0,05) para os parâmetros avaliados entre os tratamentos BL (207 células e

0,0207 de IDA) e BL/BDNF (200 células e 0,0284 de IDA) (Tabela 8).

**Tabela 7** - Desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos à pré-maturação *in vitro* suplementados ou não com BDNF, seguido de maturação *in vitro* sem BDNF e ativação partenogenética

#### Desenvolvimento embrionário

Grupo	N°oócitos	1°CP n (%)	D2 n (%)	D7 n (%)	D8 n (%)	Ec.D8 n (%)
BL	442	324(73,3)	187(57,7) <sup>a</sup>	115(35,5)	117(36,1)	38(33,0)
BL/BD	460	348(75,6)	227(65,2) <sup>b</sup>	144(41,4)	143(41,1)	54(37,5)

1℃P, 1° corpúsculo polar; D2, clivagem no 2° dia; D7, blastocisto no 7° dia; D8, blastocisto no 8°dia; Ec.D8, blastocistos eclodidos no 8° dia. BL: prématuração por 24h e posterior maturação *in vitro* por 24h; BL/BD; pré-maturação por 24h com suplementação de BNDF e posterior maturação *in vitro* por 24h. A taxa de 1℃P foi calculada sobre o total de oócitos. As taxas de D2, D7 e D8 foram calculadas sobre os oócitos que extruíram o 1℃P. A taxa de Ec.D8 foi calculada sobre blastocisto no D7. EP(±): erro padrão. Resultados referentes a cinco repetições.

**Tabela 8 -** Avaliação da fragmentação de DNA dos embriões produzidos *in vitro* após ativação partenogenética de oócitos prématurados na ausência ou presença de BDNF

Grupo	Embriões	Média de células	Células TUNEL +	Índice de apoptose
		M ± EP	n	IDA ± EP
BL	10	207±1,4	43	0,0207±0,006
BL/BD	10	200±1,2	57	0,0284±0,008

BL: pré-maturação por 24h e posterior maturação *in vitro* por 24h; BL/BD; pré-maturação por 24h com suplementação de BNDF e posterior maturação *in vitro* por 24h, foram avaliados quanto ao número médio de células (M) e índice de apoptose (IDA). EP(±): erro padrão.

# 5.3 EXPERIMENTO 4: TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO

## 5.3.1 AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA DA LINHAGEM CELULAR DOADORA DE NÚCLEO

A normalidade cromossômica da linhagem celular doadora de núcleo (fibroblastos) foi avaliada em 20 metáfases de cada linhagem celular utilizada nos experimentos de transferência de núcleo (Figura 6b), sendo que todas as linhagens foram consideradas normais (Tabela 9).

**Tabela 9** - Porcentagem da normalidade cromossômica das linhagens celulares doadoras de núcleo utilizadas nos experimentos de transferência de núcleo

Linhagem celular	Metáfases normais	Metáfases anormais	Total de metáfases	Normalidade da linhagem
Animal 1	16	4	20	80%
Animal 11	19	1	20	95%
Animal 36	18	2	20	90%
Animal 38	18	2	20	90%
Animal 43	18	2	20	90%
Animal 45	18	2	20	90%

5.3.2 Transferência de núcleo de oócitos maturados *in vitro* e oócitos pré-maturados *in vitro* suplementados de BDNF

No experimento de transferência de nucleo o grupo BL/BDNF apresentou aumento (P<0,05) em relação ao grupo MIV, respectivamente, para extrusão do 1°CP (69,3 e 63,5%) e taxa de fusão (79,2 e 72,9%). Porém, para os outros parâmetros avaliados tais como clivagem (66,1 e 67,5%), produção de blastocisto no sétimo (20,0 e 19,4%) e oitavo dia de cultivo (21,1 e 20,4%), não foram encontradas diferenças significativas (P>0,05) (Tabela 10).

Também foi realizada a avaliação da fragmentação de DNA dos embriões produzidos. Os embriões dos grupos MIV (n=15) e BL/BD (n=15) foram avaliados quanto ao número médio de células e IDA. Não foram observadas diferenças (P>0,05) para os parâmetros avaliados entre os tratamentos MIV (138 células e 0,015 de IDA) e BL/BDNF (127 células e 0,019 de IDA) (Tabela 11).

**Tabela 10 -** Desenvolvimento embrionário dos oócitos maturados *in vitro* e dos oócitos submetidos à pré-maturação na presença de BDNF, seguido de maturação sem BDNF e a transferência de núcleo

#### Desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos à transferência de núcleo

Grupo	Oócitos	1°CP	Oócitos reconstruídos	Oócitos fundidos	D2	D7	D8
	n	n (%)	N	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
MIV	1006	639 (63,5) <sup>a</sup>	473	345 (72,9) <sup>a</sup>	228 (66,1)	69 (20,0)	73 (21,2)
BL/BD	1000	693 (69,3) <sup>b</sup>	501	397 (79,2) <sup>b</sup>	268 (67,5)	77 (19,4)	81 (20,4)

<sup>1℃</sup>P, 1° corpúsculo polar; D2, clivagem no 2° dia; D7, blastocisto no 7° dia; D8, blastocisto no 8℃ia. A taxa de 1℃P foi calculada sobre o total de oóc itos, a de fusão foi calculada sobre oócitos reconstruídos e taxas de D2, D7 e D8 foram calculadas sobre os oócitos fundidos. a-b Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (P<0,05). Resultados referentes a 6 repetições.

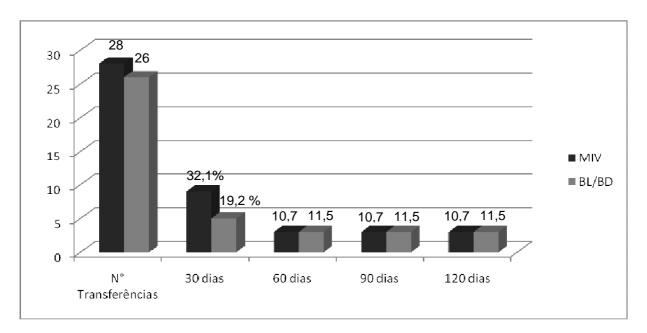
Tabela 11 - Fragmentação de DNA nos embriões produzidos in vitro após a transferência de núcleo

Grupo	N°Embriões	Média de células	Células TUNEL +	Índice de apoptose	
		M ± EP	n	IDA ± EP	
MIV	15	138±13,0	39	0,0188±0,004	
BL/BD	15	127±15,2	40	0,0209±0,004	

MIV: maturação *in vitro* por 24h; BL/BD: pré-maturação por 24h com suplementação de BNDF e posterior maturação *in vitro* por 24h foram avaliados quanto ao número médio de células (M) e índice de apoptose (IDA). EP(±): erro padrão.

## 5.4 EXPERIMENTO 5: DESENVOLVIMENTO IN VIVO DE EMBRIÕES CLONADOS

Com relação às taxas de prenhez aos 30 (32,1 e 19,2% para MIV e BL/BD, respectivamente), aos 60 (10,7 e 11,5% para MIV e BL/BD, respectivamente), aos 90 (10,7 e 11,5% para MIV e BL/BD, respectivamente) e aos 120 (10,7 e 11,5% para MIV e BL/BD, respectivamente) dias de gestação não foi encontrada diferença (P>0,05) entre os grupos (Figura 6).



**Figura 6 -** Taxas de prenhezes diagnosticadas positivamente aos 30, 60, 90 e 120 dias de gestação em relação ao total de embriões transferidos.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a pré-maturação suplementada com BDNF proporcionou aumento na taxa de maturação de oócitos bovinos. Ainda, ambos os grupos (MIV e BL/BD) foram capazes de produzir blastocistos e gestações avançadas de forma similar através da técnica de transferência de núcleo.

A taxa de maturação *in vitro* é avaliada em muitos estudos por ser indicativa da qualidade oocitária, além de mostrar a eficiência do sistema da MIV. Estudos com camundongos sugerem que o BDNF possui um papel importante durante o período de maturação, embora os mecanismos envolvidos neste processo ainda não tenham sido totalmente elucidados.

O efeito benéfico da suplementação dos meios com BDNF durante a maturação de oócitos foi relatado em humanos, camundongos e suínos (SEIFER et al., 2002a; KAWAMURA et al., 2005; LEE et al., 2007). No presente estudo, porém, nenhum efeito da adição de BDNF nos meios durante a MIV de oócitos bovinos foi encontrado.

Martins da Silva et al, (2005) também não observaram melhoras nas taxas de MII de oócitos bovinos com a utilização de BDNF. Os relatos contraditórios podem ser devido às variações nas condições experimentais ou em função de diferenças entre as espécies (HONG et al., 2009). A falta de efeito do BDNF nas taxas de MII, pode ter sido ocasionada pelo uso de soro bovino fetal (SFB) nos meios de cultivo, o que minimizaria o efeito do BDNF.

Alguns autores já constataram a presença de BDNF tanto no soro como no plasma sanguíneo humano e observaram que a sua concentração varia de acordo com a fase do ciclo reprodutivo no qual as mulheres se encontravam (BEGLIUOMINI et al., 2007). Uma vez que o BDNF é estocado nas plaquetas e que o soro as possui em maior quantidade, sabe-se que o BDNF está presente no soro em grandes concentrações. Desta forma, como já foi relatada a presença de BDNF no soro humano, é possível que o soro bovino também possua este fator, mesmo não havendo relatos anteriores.

Dentre as alternativas utilizadas por alguns pesquisadores, a mais comum é a substituição do soro por PVA, PVP ou por BSA. Tais substâncias são mais definidas e ao ser adicionadas nos meios utilizados na MIV e PIV de embriões, o real efeito de uma droga ou um fator utilizado pode ser avaliado com maior precisão. Com a utilização do soro torna-se mais difícil mensurar o papel específico de algum componente adicionado sobre os processos celulares, pois não se sabe ao certo quais fatores e em quais concentrações estão presentes no meio de cultura após sua adição (CUI et al., 2004).

Martins da Silva et al. (2005) inferem que o soro não pode ser substituído pelo o BDNF durante a maturação. Em todos os tratamentos livres de soro que foram suplementados com o BDNF as taxas de maturação foram inferiores quando comparados ao controle (10% de soro).

Ainda, estudos prévios mostraram que a MIV sem soro prejudica a maturação (MII) dos oócitos e desta forma, somente cerca de 50 a 60% dos oócitos conseguem atingir a maturação. Em contrapartida, quando se utiliza SBF durante esse período a maioria dos oócitos (80 a 90%) atinge a maturação completa (LONERGAN et al., 1994; ALI; SIRARD, 2002).

A opção pela utilização dos meios suplementados com 10% SFB foi não somente baseada nas informações anteriores, mas também teve como intenção a observação e avaliação de um possível efeito do BDNF nos meios já padronizados e utilizados rotineiramente em nosso laboratório para a PIV, já que ainda não é conhecido um substituto eficaz para o soro.

Ao contrário de nosso trabalho, alguns autores utilizaram outras concentrações de SBF (5%) e de BDNF (3 ng/mL) (KAWAMURA et al., 2005) ou optaram pela substituição do soro por PVA (0,1%) e adição de 30 ng/mL de BDNF (LEE et al., 2007) e observaram melhoras nas taxa de maturação, mas esses trabalhos foram realizados em outras espécies.

Na pré-maturação *in vitro* observamos um aumento (Tabela 5) da taxa de MII dos oócitos cultivados na presença de BDNF em relação aos não suplementados. Os meios utilizados no bloqueio não possuem a adição de SBF, o que permitiu evidenciar o efeito do BDNF durante o período de pré-maturação.

Sabe-se que as células da granulosa secretam BDNF de uma maneira proporcional ao tempo de cultivo dos oócitos *in vitro*. Seifer et al. (2002), cultivando oócitos humanos por horários diferentes (24 ou 48 horas), observaram um aumento significativo da concentração de BDNF no grupo cultivado por um maior período.

No grupo pré-maturado, adicionamos o BDNF apenas durante a prématuração, pois no experimento anterior (com a adição de BDNF na maturação) não foi observado melhora nas taxas MII durante o período da MIV. Desta maneira, optamos por não utilizar o BDNF na maturação depois do bloqueio.

Quando ainda dentro do folículo o oócito permanece naturalmente bloqueado no estádio de vesícula germinativa por meio de sinais inibidores sintetizados pelas células foliculares e da granulosa (SIRARD et al., 1998). Um dos fatores

responsáveis pela manutenção dos oócitos bloqueados nesta fase é a presença de altos níveis de AMPc presentes nos oócitos.

Seifer et AL. (2002), observaram que há uma relação dependentemente positiva entre os níveis de BDNF secretados pelas células do *cumulus* e os níveis de AMPc. Conforme aumentavam a concentração de AMPc durante o cultivo, maior era o aumento da produção e secreção de BDNF.

O nível elevado de AMPc no *cumulus* pode atuar de forma benéfica através das junções *Gap*, culminado com a secreção de BDNF pelo oócito, que pode agir de forma autócrina ou parácrina no aumento do efeito do BDNF derivado do *cumulus* (MARTINS DA SILVA et al., 2005).

Sabe-se ainda que o BDNF é produzido pelas células foliculares (células murais) quando o oócito ainda está no interior do folículo (SEIFER et al., 2002b) e que o BDNF está presente no líquido folicular de mulheres reprodutivamente saudáveis, sugerindo um papel importante dessa neurotrofina durante os estágios anteriores à maturação (MONTELEONE et al., 2007). Com estes achados e com os nossos resultados durante a pré-maturação, mesmo não havendo relatos anteriores da utilização de BDNF durante o bloqueio, podemos sugerir que seu efeito possa ser mais benéfico em estádios anteriores da maturação (pré-maturação), pois os níveis de AMPc nesta fase estão mais elevados. No entanto, seria necessária a mensuração dos níveis de AMPc durante o período da pré-maturação para confirmar essa possível relação.

Durante o desenvolvimento embrionário, a adição de BDNF na maturação proporcionou a redução da taxa de formação de pró-núcleo em relação ao grupo não suplementado (Tabela 2). Por outro lado, a adição durante o bloqueio proporcionou um aumento da taxa de clivagem dos oócitos.

Os autores que utilizaram o BDNF durante a maturação dos oócitos e posteriormente avaliaram o desenvolvimento embrionário *in vitro*, seja ele por fecundação, ativação partenogenética ou transferência de núcleo não avaliaram a formação de pró-núcleos (SEIFER et al., 2002a; KAWAMURA et al., 2005; MARTINS DA SILVA et al., 2005; LEE et al., 2007).

Méo et al. (2007), produzindo embriões bovinos partenotos com o mesmo protocolo de ativação utilizado no nosso experimento, obtiveram taxa de pró-núcleo de 73,3% com 15-16 horas de ativação. A formação pró-nuclear de todos os grupos no nosso trabalho variou de 64,1 a 91,1% com o mesmo tempo de ativação, mostrando que nossos resultados estão condizentes com os encontrados na literatura.

Mesmo com a redução da formação de pró-núcleos nos oócitos maturados na presença de BDNF, não foi observado prejuízo no posterior desenvolvimento embrionário em relação ao grupo controle. Com esses achados sugerimos que o BDNF não prejudica o desenvolvimento de embriões bovinos até estádio de blastocisto aos oito dias de cultivo (D8), porém não trouxe benefícios nas condições estudadas.

Martins et al. (2005), porém, observaram melhora na produção de blastocistos bovinos produzidos quando utilizaram a neurotrofina durante a maturação. Outros pesquisadores tratando oócitos com BDNF também obtiveram melhoras no desenvolvimento após a fecundação *in vitro* (KAWAMURA et al., 2005; LEE et al., 2007), a transferência de núcleo (LEE et al., 2007) e a ativação partenogenética (MARTINS DA SILVA et al., 2005).

Trabalhando com oócitos murinos, Kawmamura et al. (2005), observaram durante o desenvolvimento embrionário aumento na taxa de clivagem (duas células)

e produção de blastocitos. Assim como Kawmamura et al. (2005), observamos uma melhora apenas na taxa de clivagem dos embriões no segundo dia de cultivo, porém isso foi observado somente durante a pré-maturação com a adição de BDNF (Tabela 6). Não foi relatado um efeito benéfico do BDNF sobre a clivagem dos embriões bovinos (MARTINS DA SILVA et al., 2005), porém, este autor sugere que o BDNF pode estimular tanto a clivagem embrionária inicial quanto a formação de blastocisto. Quando foi utilizado um anticorpo para bloquear o efeito do BDNF, uma redução da taxa de clivagem, tanto para os grupos maturados com ou sem células do *cumulus*, foi observada, sugerindo um efeito desta neurotrofina sobre as divisões mitóticas embrionárias. Nenhum relato foi encontrado na literatura em relação ao efeito do BDNF sobre o desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos a prématuração.

A quantidade total de células assim como a fragmentação de DNA dos embriões produzidos a partir dos grupos maturados ou pré-maturados na presença ou na ausência de BDNF também foi avaliada no presente estudo.

A contagem do número de células dos blastocistos é um bom indicador da qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (WANG et al., 2008), assim como a análise da incidência de apoptose nos blastocistos no estudo da qualidade embrionária (JURISICOVA et al., 1996; BRISON; SCHULTZ, 1997; SPANOS et al., 2000; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002).

Kawanura et al. (2005) apesar de observarem uma melhora na produção embrionária, relataram que os embriões produzidos, independente do tratamento utilizado (grupo controle ou grupos suplementados com BDNF) não apresentam diferença com relação ao número total de células.

Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo, pois não houve diferença entre os grupos experimentais avaliados. Porém, vale ressaltar que nossos tratamentos resultaram em blastocistos com maior número médio de células do que nos produzidos por Wang et al. (2008) e Méo et al. (2007). Os embriões partenotos produzidos no presente trabalho possuem maior quantidade células e menor incidência de células apoptóticas. Talvez a variação no número de células e da porcentagem de apoptose possa estar relacionada com o tempo de cultivo dos embriões, pois nos trabalhos acima citados, os blastocistos fixados estavam no sétimo dia, enquanto que os blastocistos do nosso experimento estavam no oitavo dia de cultivo.

De acordo com os resultados obtidos foi selecionado um grupo de cada tratamento (MIV e BL/BD) para o experimento de transferência de núcleo. Neste experimento o grupo bloqueado com BDNF obteve maior extrusão do 1°CP e maior taxa de fusão em relação ao controle (grupo somente maturado).

A ocorrência de uma aceleração da cinética da maturação após a prématuração com BLI foi descrita na literatura (HASHIMOTO et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2006), o que poderia levar a uma maior taxa de maturação, visto que a avaliação foi realizada com 19 horas, ou seja, antes de completar as 24 de maturação. Desta, um envelhecimento oocitário pelo tempo de cultivo pode ter ocorrido (KRISHER, 2004).

Lagutina et al. (2002), também observaram uma aceleração da maturação nuclear de oócitos bovinos pré-maturados com roscovitina. Estes autores observaram que os oócitos pré-maturados iniciaram a extrusão do 1°CP 11 horas depois do início da maturação, ou seja, 4 horas antes que o grupo controle. Porém, mesmo havendo essa aceleração da maturação, o grupo dos oócitos pré-maturados

apresentou redução na taxa de extrusão do 1℃P em relação ao controle às 24 horas de maturação.

Às 19 horas de maturação, a taxa de extrusão do 1°CP dos grupos maturados e pré-maturados foi semelhante, aproximadamente 80% (LAGUTINA et al., 2002). No presente estudo, às 19 horas de maturação o grupo bloqueado com BDNF apresentou maior extrusão do 1°CP que o grupo maturado (Tabela 10), este resultado vem confirmar os resultados do nosso segundo experimento o que sugere um efeito da pré-maturação e do BDNF na maturação, evidenciado pela extrusão do 1°CP.

O uso de inibidores é normalmente utilizado em experimentos de transferência de núcleo para sincronização do ciclo celular das células doadoras de núcleo nas fases de G0/G1, como já foi relatado em bovinos (GIBBONS et al., 2002; BORDIGNON; SMITH, 2006), em equinos (HINRICHS et al., 2007), em suínos (TOMII et al., 2008) e em cães (KOO et al., 2009).

Somente Lagutina et al, (2002) utilizaram um inibidor do ciclo celular, no caso, a roscovitina, em oócitos bovinos posteriormente submetidos à transferência de núcleo. Neste trabalho, os autores avaliaram somente o desenvolvimento *in vitro* dos embriões clonados e observaram a redução da taxa de clivagem dos oócitos tratados (70,5%) em relação aos não tratados (94,1%) (LAGUTINA et al., 2002). Porém, mesmo havendo a redução na taxa de clivagem durante o bloqueio, não foi observado prejuízo no posterior desenvolvimento embrionário.

No experimento de transferência de núcleo do presente estudo, observamos um pequeno benefício (aumento da extrusão do 1°CP e da taxa de clivagem) para o grupo pré-maturado, porém isso também não se refletiu no posterior desenvolvimento embrionário e as taxas de blastocistos foram semelhantes entre o

controle (20%) e o grupo bloqueado (19,4%). Lagutina et al, (2002) obtiveram uma taxa de produção de blastocisto de ambos os grupos (42,6 e 29,5% para o controle e para a pré-maturação respectivamente) maiores que as taxas encontradas em nosso experimento. Porém, encontramos na literatura alguns trabalhos que possuem taxas de embriões clones semelhantes (YANG et al., 2006;) e inferiores (KUBOTA et al., 2000; GIBBONS et al., 2002) com as taxas encontradas em nosso trabalho, o que sugere que há uma variação entre os resultados de diferentes grupos de pesquisa.

Não foi observada variação no número de células dos embriões produzidos por clonagem em nosso exerimento e estes resultados estão de acordo com os encontrados por Lagutina et al (2002) onde demonstraram não haver diferença entre o número de células dos embriões clonados produzidos independente do tratamento (somente maturado ou pré-maturado).

O número de células dos blastocistos produzidos por Lagutina (2002) foram de 131 células para o grupo controle e de 140 para o grupo bloqueado. No grupo controle e no pré-maturado durante o nosso experimento, obtivemos blastocistos com número médio de células de 138 e 127, respectivamente.

A quantidade de células com fragmentação de DNA também não foi afetada pela pré-maturação, o que sugere que os embriões produzidos, pré-maturados ou somente maturados possuem qualidade semelhante. Os autores acima citados, não avaliaram a qualidade dos embriões produzidos.

Após a transferência dos blastocistos para as receptoras foi observado que ambos os grupos foram capazes de estabelecer prenhezes avançadas (mais de 120 dias de gestação) de forma similar.

A obtenção de implantação, estabelecimento de prenhezes e desenvolvimento até os 30-35 dias de gestação de embriões clones bovinos são

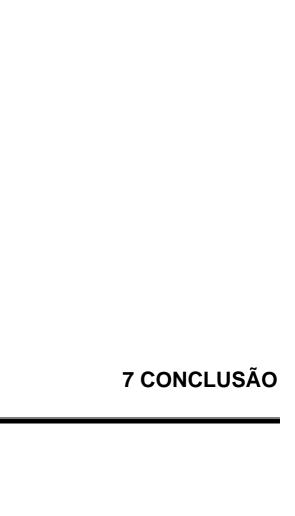
semelhantes aos embriões fertilizados normalmente (GALLI et al., 1999). Não observamos diferença entre os grupos aos 30 dias de gestações. Esses achados estão condizentes com os resultados encontrados com a utilização de inibidores do ciclo celular (roscovitina) na produção de embriões clones transgênicos (SALAMONE et al., 2007).

Entretanto, sabe-se que no diagnóstico aos 90 dias de gestação, em mais da metade das prenhezes estabelecidas por embriões clones ocorre o aborto (CIBELLI et al., 1998). Hill et al. (2000), afirmam que esta perda gestacional é ainda maior e desde o momento em que os embriões são transferidos até os 90 dias de gestação, cerca de 80% das prenhezes obtidas por transferência de núcleo são perdidas.

Os resultados encontrados por Cibelli (1998) concordam com os nossos relativos às prenhezes geradas do grupo controle, ocorrendo mais da metade (66,7%) de perdas gestacionais aos 90 dias de gestação. Porém, dentre as gestações estabelecidas por embriões produzidos a partir da pré-maturação, observamos 40% de perdas gestacionais aos 90 dias, ou seja, obtivemos uma redução de 26,7% das perdas em relação ao grupo controle. Portanto, podemos especular que aumentando o número de transferências de embriões de ambos os grupos, talvez possamos vir a observar uma diferença significativa em relação às perdas gestacionais.

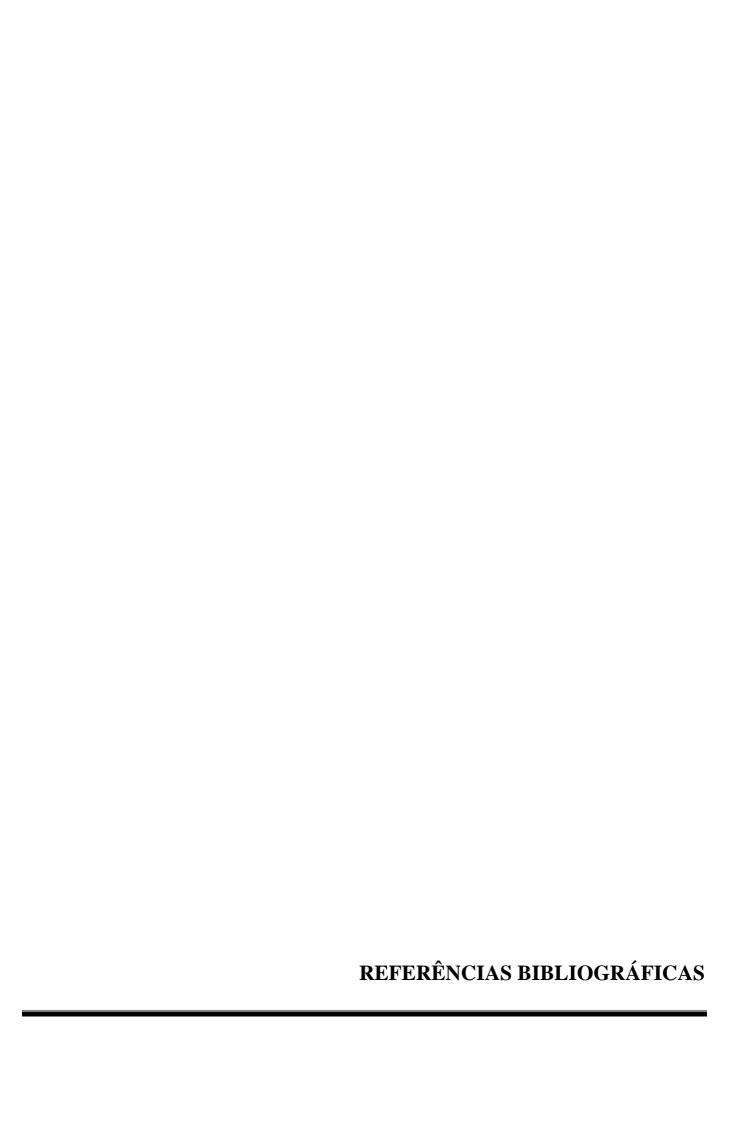
Ainda, o uso de inibidores do ciclo celular pode ser extremamente útil para o sistema de PIV de embriões devido à necessidade da utilização de oócitos em horários específicos (LAGUTINA et al., 2002). Desta maneira, de uma perspectiva aplicada, estes resultados contribuem de forma benéfica para a PIV, pois provém um método eficaz para aumentar a flexibilidade no processo de produção *in vitro* embrionária, permitindo o ajuste no tempo da pré-maturação e da maturação às

necessidades dos laboratórios de FIV e principalmente dos laboratórios de clonagem (LAGUTINA et al., 2002; GALLI et al., 2003).



## 7 CONCLUSÃO

- A pré-maturação em oócitos bovinos não prejudica o posterior desenvolvimento e qualidade de embriões partenogenéticos.
- 2) A suplementação do meio de cultivo com BDNF proporcionou melhor competência meiótica (taxa de maturação) dos oócitos apenas durante a prématuração, porém, não favoreceu o desenvolvimento embrionário.
- O citoplasma de oócitos pré-maturados é capaz de reprogramar o núcleo de uma célula somática e produzir embriões e gestações avançadas (mais de 120 dias).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIEU, A.; DOREE, M.; FISHER, D., The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. **J Cell Sci.** v.114, n.Pt 2, Jan, p.257-67. 2001.

ADONA, P. R.;LIMA VERDE LEAL, C., Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote.** v.12, n.3, Aug, p.197-204. 2004.

ADONA, P. R., et al., Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. **Anim Reprod Sci.** v.104, n.2-4, Mar 3, p.389-97. 2008.

ALI, A.;SIRARD, M. A., Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Biol Reprod.** v.66, n.4, Apr, p.901-5. 2002.

ARAUJO, C.H.M., *et al.*, Gametogenesis: fundamental stage the development for human reproduction. **Medicina**, v 40, p 551-558, 2007.

\_\_\_\_\_, Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. **Reproduction.** v.130, n.3, Sep, p.303-10. 2005.

ANDERIESZ, C., et al., Regulation of human and mouse oocyte maturation in vitro with 6-dimethylaminopurine. **Hum Reprod.** v.15, n.2, Feb, p.379-88. 2000.

AVERY, B., *et al.*, Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylaminopurine prior to *in vitro* maturation. **Mol Reprod Dev.** v.50, n.3, Jul, p.334-44. 1998.

BAGUISI, A., *et al.*, Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat Biotechnol.** v.17, n.5, May, p.456-61. 1999.

BEGLIUOMINI, S., et al., Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor. **Hum Reprod.** v.22, n.4, Apr, p.995-1002. 2007.

BETTY, R.A. Parthenogenisis and polyploidy in mammalian development. Cambridge: Cambridge University Press, 1957.

BILODEAU-GOESELS, S., Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. **Theriogenology.** v.60, n.9, Dec, p.1679-90. 2003.

BORDIGNON, V.;SMITH, L. C., Telophase-stage host ooplasts support complete reprogramming of roscovitine-treated somatic cell nuclei in cattle. **Cloning Stem Cells.** v.8, n.4, Winter, p.305-17. 2006.

BOS-MIKICH, A.; WHITTINGHAM, D. G.; JONES, K. T., Meiotic and mitotic Ca2+ oscillations affect cell composition in resulting blastocysts. **Dev Biol.** v.182, n.1, Feb 1, p.172-9. 1997.

BRISON, D. R.;SCHULTZ, R. M., Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. **Biol Reprod.** v.56, n.5, May, p.1088-96. 1997.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. **Theriogenology.** v.43, p.1115-28, 1986.

CAMPBELL, K. H., et al., Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. **Rev Reprod.** v.1, n.1, Jan, p.40-6. 1996.

CAN, A.; SEMIZ, O.; CINAR, O., Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Mol Hum Reprod.** v.9, n.12, Dec, p.749-56. 2003.

CHAVATTE-PALMER, P., et al., Health status of cloned cattle at different ages. Cloning Stem Cells. v.6, n.2, p.94-100. 2004.

CHEONG, H. T.; TAKAHASHI, Y.;KANAGAWA, H., Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. **Biol Reprod.** v.48, n.5, May, p.958-63. 1993.

CHERR, G. N.; DROBNIS, E. Z.; KATZ, D. F., Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **J Exp Zool.** v.246, n.1, Apr, p.81-93. 1988.

CHESNE, P., et al., Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nat Biotechnol.** v.20, n.4, Apr, p.366-9. 2002.

CIBELLI, J., Developmental biology. A decade of cloning mystique. **Science.** v.316, n.5827, May 18, p.990-2. 2007.

CIBELLI, J. B., et al., Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science.** v.280, n.5367, May 22, p.1256-8. 1998.

COLLAS, P.; BALISE, J. J.;ROBL, J. M., Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. **Biol Reprod.** v.46, n.3, Mar, p.492-500. 1992.

COY, P., et al., Birth of piglets after transferring of *in vitro*-produced embryos prematured with R-roscovitine. **Reproduction.** v.129, n.6, Jun, p.747-55. 2005.

CRAN, D. G.; ESPER, C. R., Cortical granules and the cortical reaction in mammals. **J Reprod Fertil Suppl.** v.42, p.177-88. 1990.

CUI, X. S., *et al.*, Fetal bovine serum influences apoptosis and apoptosis-related gene expression in porcine parthenotes developing *in vitro*. **Reproduction.** v.127, n.1, Jan, p.125-30. 2004.

CZOLOWSKA, R.; MODLINSKI, J. A.; TARKOWSKI, A. K., Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes. **J Cell Sci.** v.69, Jul, p.19-34. 1984.

DAVIES, A. M., Neurotrophins: neurotrophic modulation of neurite growth. **Curr Biol.** v.10, n.5, Mar 9, p.R198-200. 2000.

DE LA FUENTE, R.; EPPIG, J. J., Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. **Dev Biol.** v.229, n.1, Jan 1, p.224-36. 2001.

DE LA FUENTE, R.;KING, W. A., Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes. **Biol Reprod.** v.58, n.4, Apr, p.952-62. 1998.

DE SOUSA, P. A., et al., Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. **Biol Reprod.** v.66, n.3, Mar, p.642-50. 2002.

\_\_\_\_\_\_, Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biol Reprod.** v.65, n.1, Jul, p.23-30. 2001.

DIELEMAN, S. J., et al., Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology.** v.57, n.1, Jan 1, p.5-20. 2002.

DINDOT, S. V., et al., Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived Bos gaurus/Bos taurus hybrid fetuses. **Biol Reprod.** v.71, n.2, Aug, p.470-8. 2004.

DISSEN, G. A., et al., A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. **Endocrinology.** v.137, n.1, Jan, p.198-209. 1996.

DODE, M. A.; ADONA, P. R., Developmental capacity of Bos indicus oocytes after inhibition of meiotic resuption by 6-dimethylaminopurine. **Anim Reprod Sci.** v.65, n.3-4, Mar 30, p.171-80. 2001.

DONNAY, I., et al., Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. **Theriogenology.** v.62, n.6, Sep 15, p.1093-107. 2004.

EYERS, P. A., et al., Regulation of the G(2)/M transition in Xenopus oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. **J Biol Chem.** v.280, n.26, Jul 1, p.24339-46. 2005.

FABER, D. C., *et al.*, Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology.** v.59, n.1, Jan 1, p.125-38. 2003.

FLETCHER, C. J., et al., Somatic cell nuclear transfer in the sheep induces placental defects that likely precede fetal demise. **Reproduction.** v.133, n.1, Jan, p.243-55. 2007.

GALLI, C., et al., Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. **Cloning.** v.1, n.3, p.161-70. 1999.

\_\_\_, Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. Nature. v.424, n.6949, Aug 7, p.635, 2003. GIBBONS, J., et al., Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitinetreated adult somatic cells. **Biol Reprod.** v.66, n.4, Apr, p.895-900. 2002. GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G., Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. Theriogenology. v.67, n.1, Jan 1, p.6-15. 2007. GURDON, J. B.; BYRNE, J. A., The first half-century of nuclear transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A. v.100, n.14, Jul 8, p.8048-52. 2003. HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, Maturação Ovocitária e Ovulação. In:\_\_\_\_\_. Reprodução Aminal. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 69-82. HAJNOCZKY, G.; DAVIES, E.; MADESH, M., Calcium signaling and apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun.** v.304, n.3, May 9, p.445-54, 2003. HASHIMOTO, S., et al., Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. **Biol Reprod.** v.66, n.6, Jun, p.1696-701. 2002. HASHIMOTO, S., et al., Oocyte transport: Developmental competence of bovine oocytes arrested at germinal vesicle stage by cyclohexamide under air. Juornal of Reproduction and Development. v.49, n 1,Set, p. 61-66. 2003. HASHIZUME, K., et al., Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. Cloning Stem Cells. v.4, n.3, p.197-209. 2002. HENDRIKSEN, P. J., et al., Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. Theriogenology. v.53, n.1, Jan 1, p.11-20. 2000. HILL, J. R., et al., Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biol Reprod.** v.63, n.6, Dec. p.1787-94. 2000. , Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from

adult and fetal cells. Biol Reprod. v.62, n.5, May, p.1135-40. 2000.

HINRICHS, K., et al., Production of cloned horse foals using roscovitine-treated donor cells and activation with sperm extract and/or ionomycin. **Reproduction.** v.134, n.2, Aug, p.319-25. 2007.

HONG, SG, *et al.*,The effects of brain-derived neurotrophic factor and metformin on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Zygote**. v.17, p. 1-7 2009.

HOUDEBINE, L. M., Transgenic animal bioreactors. **Transgenic Res.** v.9, n.4-5, p.305-20. 2000.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B., Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Dev Biol.** v.296, n.2, Aug 15, p.514-21. 2006.

HYTTEL, P., *et al.*, Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. **Teriogenology**. v. 47, p. 23-32, 1997.

JONES, K. T., Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Mol Hum Reprod.** v.10, n.1, Jan, p.1-5. 2004.

JOUNEAU, A.; RENARD, J. P., Reprogramming in nuclear transfer. **Curr Opin Genet Dev.** v.13, n.5, Oct, p.486-91. 2003.

JURISICOVA, A.; VARMUZA, S.; CASPER, R. F., Programmed cell death and human embryo fragmentation. **Mol Hum Reprod.** v.2, n.2, Feb, p.93-8. 1996.

KANO, F., et al., MEK and Cdc2 kinase are sequentially required for Golgi disassembly in MDCK cells by the mitotic Xenopus extracts. **J Cell Biol.** v.149, n.2, Apr 17, p.357-68. 2000.

KATO, Y., et al., Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science.** v.282, n.5396, Dec 11, p.2095-8. 1998.

KAWAMURA, K., et al., Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.102, n.26, Jun 28, p.9206-11. 2005.

KAWAMURA, K, *et al.*, Regulation of preimplantation embryo development by brain-derived neurotrophic factor. **Dev. Biol**. v. 311, p. 147-158, 2007.

KAWAMURA, K, et al., Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. **Endocrinology**.2009

KEEFER, C. L., Lessons learned from nuclear transfer (cloning). **Theriogenology.** v.69, n.1, Jan 1, p.48-54. 2008.

KIM, N. H., *et al.*, The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Zygote.** v.8, n.1, Feb, p.25-32. 2000.

KOO, O. J., et al., Cell cycle synchronization of canine ear fibroblasts for somatic cell nuclear transfer. **Zygote.** v.17, n.1, Feb, p.37-43. 2009.

KRISHER, R. L., The effect of oocyte quality on development. **J Anim Sci.** v.82 E-Suppl, p.E14-23. 2004.

KUBELKA, M., *et al.*, Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity. **Biol Reprod.** v.62, n.2, Feb, p.292-302. 2000.

KUPKER, W.; DIEDRICH, K.; EDWARDS, R. G., Principles of mammalian fertilization. **Hum Reprod.** v.13 Suppl 1, Apr, p.20-32. 1998.

LAGUTINA, I., *et al.*, Kinetics of oocyte maturation and subsequent development of IVF, parthenogenetic, and NT bovine embryos after meiotic inhibition with roscovitine. **Cloning Stem Cells.** v.4, n.2, p.113-9. 2002.

LATHAM, K. E., Cloning: questions answered and unsolved. **Differentiation.** v.72, n.1, Feb, p.11-22. 2004.

LEE, E., et al., Beneficial effects of brain-derived neurotropic factor on *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Reproduction.** v.134, n.3, Sep, p.405-14. 2007.

LEE, R. S., et al., Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. **Biol Reprod.** v.70, n.1, Jan, p.1-11. 2004.

LEFEBVRE, C., et al., Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. **J Cell Biol.** v.157, n.4, May 13, p.603-13. 2002.

LIU, H.; AOKI, F., Transcriptional activity associated with meiotic competence in fully grown mouse GV oocytes. **Zygote.** v.10, n.4, Nov, p.327-32. 2002.

LOI, P., et al., Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. **Biol Reprod.** v.58, n.5, May, p.1177-87. 1998.

LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P., Development of bovine embryos *in vitro* following oocyte maturation under defined conditions. **Reprod Nutr Dev.** v.34, n.4, p.329-39. 1994.

LONERGAN, P., et al., Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. **Mol Reprod Dev.** v.57, n.2, Oct, p.204-9. 2000.

MARTINS DA SILVA, S. J., et al., Brain-derived neurotrophic factor promotes bovine oocyte cytoplasmic competence for embryo development. **Reproduction.** v.129, n.4, Apr, p.423-34. 2005.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A., The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology.** v.55, n.4, Mar 1, p.911-22. 2001.

\_\_\_\_\_, Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. **Biol Reprod.** v.66, n.1, Jan, p.180-4. 2002.

MEINECKE, B., et al., Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reprod Domest Anim.** v.36, n.3-4, Aug, p.183-8. 2001.

MENG, L., et al., Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. **Biol Reprod.** v.57, n.2, Aug, p.454-9. 1997.

MERMILLOD, P., *et al.*, High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Mol Reprod Dev.** v.55, n.1, Jan, p.89-95. 2000.

MONTELEONE, P., et al., Brain derived neurotrophic factor circulating levels in patients undergoing IVF. J Assist Reprod Genet. v.24, n.10, Oct, p.477-80. 2007.

MOOR, R. M., et al., Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. **J Reprod Fertil Suppl.** v.40, p.197-210. 1990.

MOTLIK, J., et al., Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. **Theriogenology.** v.49, n.2, Jan 15, p.461-9. 1998.

NIEMANN, H., *et al.*, Gene expression patterns in bovine *in vitro*-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. **Cloning Stem Cells.** v.4, n.1, p.29-38. 2002.

NOGUEIRA, D., et al., Meiotic arrest *in vitro* by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. **Biol Reprod.** v.74, n.1, Jan, p.177-84. 2006.

NUSSBAUM, D. J.; PRATHER, R. S., Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. **Mol Reprod Dev.** v.41, n.1, May, p.70-5. 1995.

OGURA, A., et al., Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse. Cloning Stem Cells. v.4, n.4, p.397-405. 2002.

OJEDA, S. R., et al., Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. **Mol Cell Endocrinol.** v.163, n.1-2, May 25, p.67-71. 2000.

ONO, Y., et al., Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. **Biol Reprod.** v.64, n.1, Jan, p.44-50. 2001.

PATERSON, L., *et al.*, Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials. Applications of reproductive cloning. **Anim Reprod Sci.** v.79, n.3-4, Dec 15, p.137-43. 2003.

PAULA-LOPES, F. F.;HANSEN, P. J., Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochem Biophys Res Commun.** v.295, n.1, Jul 5, p.37-42. 2002.

POLEJAEVA, I. A., et al., Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature.** v.407, n.6800, Sep 7, p.86-90. 2000.

PONDERATO, N., et al., Embryonic and foetal development of bovine oocytes treated with a combination of butyrolactone I and roscovitine in an enriched medium prior to IVM and IVF. **Mol Reprod Dev.** v.62, n.4, Aug, p.513-8. 2002.

\_\_\_\_\_, Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. **Mol Reprod Dev.** v.60, n.4, Dec, p.579-85. 2001.

PRATHER, R. S., et al., Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biol Reprod.** v.37, n.4, Nov, p.859-66. 1987.

PRATHER, R. S.; SIMS, M. M.; FIRST, N. L., Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biol Reprod.** v.41, n.3, Sep, p.414-8. 1989.

RICHARD, F. J.;SIRARD, M. A., Effects of harvest methods of bovine oocytes cocultured with follicular hemisections *in vitro* on nuclear maturation. **Theriogenology.** v.46, n.7, Nov 1, p.1243-50. 1996.

RÜSSE, I. Oogenesis em cattle and sheep. Blib. Anat. V. 24, p. 77-92, 1983.

SAEKI, K., *et al.*, Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. **Theriogenology.** v.48, n.7, Nov, p.1161-72. 1997.

SAX, J. K., et al., The cyclin-dependent kinase inhibitor butyrolactone is a potent inhibitor of p21 (WAF1/CIP1 expression). **Cell Cycle.** v.1, n.1, Jan, p.90-6. 2002.

SCHANG, L. M., Effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors on viral transcription and replication. **Biochim Biophys Acta.** v.1697, n.1-2, Mar 11, p.197-209. 2004.

SCHIMMEL, T. G.; COFFMAN, A. D.; PARSONS, S. J., Effect of butyrolactone I on the producing fungus, Aspergillus terreus. **Appl Environ Microbiol.** v.64, n.10, Oct, p.3707-12. 1998.

SEBASTIANO, V., *et al.*, Cloned pre-implantation mouse embryos show correct timing but altered levels of gene expression. **Mol Reprod Dev.** v.70, n.2, Feb, p.146-54. 2005.

SEIFER, D. B., et al., Brain-derived neurotrophic factor: a novel human ovarian follicular protein. **J Clin Endocrinol Metab.** v.87, n.2, Feb, p.655-9. 2002a.

\_\_\_\_\_, Neurotrophin-4/5 and neurotrophin-3 are present within the human ovarian follicle but appear to have different paracrine/autocrine functions. **J Clin Endocrinol Metab.** v.87, n.10, Oct, p.4569-71. 2002b.

SHIN, T., et al., A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature.** v.415, n.6874, Feb 21, p.859. 2002.

SIMS, M.; FIRST, N. L., Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.91, n.13, Jun 21, p.6143-7. 1994.

SIRARD, M. A., et al., Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology.** v.65, n.1, Jan 7, p.126-36. 2006.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M., Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology.** v.49, n.2, Jan 15, p.483-97. 1998.

SNIDER, W. D., Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. **Cell.** v.77, n.5, Jun 3, p.627-38. 1994.

SPANOS, S., et al., Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. **Biol Reprod.** v.63, n.5, Nov, p.1413-20. 2000.

STICE, S. L.;ROBL, J. M., Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. **Biol Reprod.** v.39, n.3, Oct, p.657-64. 1988.

STICE, S. L., et al., Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. **Biol Reprod.** v.54, n.1, Jan, p.100-10. 1996.

SZOLLOSI, D., et al., Remodelling of thymocyte nuclei in activated mouse oocytes: an ultrastructural study. **Eur J Cell Biol.** v.42, n.1, Oct, p.140-51. 1986.

TAIEB, F.; THIBIER, C.; JESSUS, C., On cyclins, oocytes, and eggs. **Mol Reprod Dev.** v.48, n.3, Nov, p.397-411. 1997.

TESSAROLLO, L., Pleiotropic functions of neurotrophins in development. **Cytokine Growth Factor Rev.** v.9, n.2, Jun, p.125-37. 1998.

TOMII, R., et al., Production of Cloned Pigs by Nuclear Transfer of Preadipocytes Following Cell Cycle Synchronization by Differentiation Induction. **J Reprod Dev.** Dec 24. 2008.

WAKAYAMA, T., et al., Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature.** v.394, n.6691, Jul 23, p.369-74. 1998.

WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R., Cloning of male mice from adult tail-tip cells. **Nat Genet.** v.22, n.2, Jun, p.127-8. 1999.

WANG, Z. G., *et al.*, Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. **Anim Reprod Sci.** v.105, n.3-4, May, p.292-301. 2008.

WARAKSA, J. A., et al., Neurotrophin-3 augments steroid secretion by hamster ovarian follicles in vitro. **Zoolog Sci.** v.12, n.4, Aug, p.499-502. 1995.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R., Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biol Reprod.** v.60, n.4, Apr, p.996-1005. 1999.

WELLS, D. N., *et al.*, Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. **Reprod Fertil Dev.** v.10, n.4, p.369-78. 1998.

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

WILLADSEN, S. M., Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature.** v.320, n.6057, Mar 6-12, p.63-5. 1986.

WILMUT, I., et al., Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature.** v.385, n.6619, Feb 27, p.810-3. 1997.

WOODS, G. L., *et al.*, A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. **Science.** v.301, n.5636, Aug 22, p.1063. 2003.

YAMAMOTO, M., et al., Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. **Neurochem Res.** v.21, n.8, Aug, p.929-38. 1996.

YANG, X. Y., et al., Improved efficiency of bovine cloning by autologous somatic cell nuclear transfer. **Reproduction.** v.132, n.5, Nov, p.733-9. 2006.

ZHOU, Q., et al., Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. **Science.** v.302, n.5648, Nov 14, p.1179. 2003.