

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CITOPLASTOS RECEPTORES PRODUZIDOS POR  
DIFERENTES TÉCNICAS DE ENUCLEAÇÃO NA  
TRANSFERÊNCIA NUCLEAR EM BOVINOS**

**Naiara Zoccal Saraiva**

**Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia**

**Co-orientadora: Dra. Simone Cristina Méo Niciura**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Fevereiro de 2010**

S243c Saraiva, Naiara Zoccal  
Citoplastos receptores produzidos por diferentes técnicas de enucleação na transferência nuclear em bovinos / Naiara Zoccal  
Saraiva. -- Jaboticabal, 2010  
xxiii, 133 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010  
Orientador: Joaquim Mansano Garcia  
Banca examinadora: Cesar Roberto Esper, Cláudia Lima Verde Leal, Fernanda da Cruz Landim Alvarenga, Paulo Henrique Franceschini  
Bibliografia

1. Bovino-clonagem. 2. Demecolcina. 3. Enucleação química. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:602.72.636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp



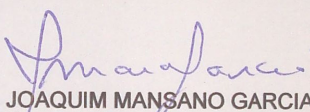
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

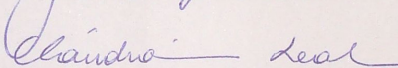
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

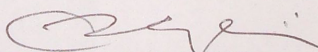
**TÍTULO:** CITOPLASTOS RECEPTORES PRODUZIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS DE ENUCLEAÇÃO NA TRANSFERÊNCIA NUCLEAR EM BOVINOS.

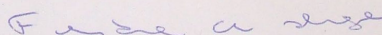
**AUTORA:** NAIARA ZOCCAL SARAIVA  
**ORIENTADOR:** Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA  
**Co-Orientador(a):** Dr(a). SIMONE CRISTINA MÉO NICIURA

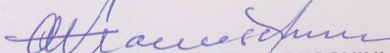
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA área de REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:

  
Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

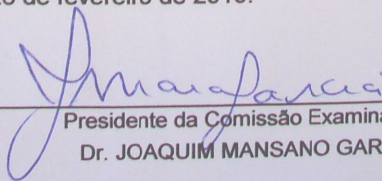
  
Dra. CLAUDIA LIMA VERDE LEAL

  
Dr. CESAR ROBERTO ESPER

  
Dra. FERNANDA DA CRUZ LANDIM ALVARENGA

  
Dr. PAULO HENRIQUE FRANCESCHINI

Data da realização: 26 de fevereiro de 2010.

  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**NAIARA ZOCCAL SARAIVA** – nascida em São Paulo – SP, aos 04 dias do mês de março de 1980; concluiu o ensino médio no Colégio Integrado Esquema Universitário, na cidade de São José do Rio Preto, em dezembro de 1997; ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Estadual de Londrina – UEL, em fevereiro de 1998; concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em fevereiro de 2003; obteve bolsa de Treinamento Técnico pela FAPESP, junto ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da UNESP – Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, de março de 2003 a fevereiro de 2004; ingressou, em março de 2004, no curso de pós-graduação, em nível de Mestrado, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, com bolsa de Mestrado da FAPESP e concluiu, em fevereiro de 2006, com a defesa da Dissertação “EFEITOS DA DEMECOLCINA NA CINÉTICA DE MATURAÇÃO, MICROTÚBULOS E NA ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OÓCITOS BOVINOS”; ingressou no curso de pós-graduação, em nível de Doutorado, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, em março de 2006, com bolsa de Doutorado e auxílio à pesquisa da FAPESP.

## EPÍGRAFE

“Viva como se fosse morrer amanhã. Aprenda como se fosse viver eternamente”

(Mahatma Gandhi)

## DEDICATÓRIA

Dedico a meus pais,  
**Carlos Augusto Saraiva e Izolina Zoccal Saraiva,**  
pelo carinho, suporte, dedicação e motivação,  
vocês são meus exemplos...meu porto-seguro....  
Valeu à pena.....

Dedico à minha irmã,  
**Onara Zoccal Saraiva,** minha melhor amiga,  
sempre me apoiando em todas as etapas de minha vida.

Dedico ao meu namorado  
**Alessandro Eduardo Camilo,**  
por todo amor, carinho, paciência, compreensão e companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus..... que me acompanha em todos os passos, todos os lugares, me ensinando o verdadeiro sentido da vida!

Ao professor orientador **Joaquim Mansano Garcia**, grande mestre e cientista, pelo idealismo, confiança, oportunidade e ensinamentos transmitidos durante todos esses anos. Sou muito grata ao senhor por ter acreditado em mim!

À co-orientadora e grande amiga **Simone Cristina Méo Niciura**, exemplo de cientista, que consegue reunir em uma só pessoa competência, carisma, humildade, inteligência intelectual e emocional..... obrigada por tudo que você fez por mim desde o início de minha jornada..... certamente muito do que aprendi devo a você!

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da Unesp – Jaboticabal, **Prof. Dr. Cesar Roberto Esper, Profa. Dra. Vera Fernanda Hossepian de Lima, Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini, Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, Prof. Dr. Francisco Guilherme Leite**, pela amizade, interesse e conhecimentos transmitidos durante todos esses anos.

À **Profa. Dra. Cláudia Lima Verde Leal**, pela disponibilidade, grande ajuda na realização de parte do projeto e amizade.

À **Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga**, pela imensa ajuda ao nos emprestar o aparelho de eletrofusão, pela confiança e pela disponibilidade em participar da banca de defesa.

À **Profa. Dra. Juliana Corrêa Borges**, grande amiga que muito colaborou com sugestões na banca de qualificação.

Aos funcionários do DRA, **Edson de Aguiar, Ivo Luiz de Almeida Jr, Isabel Aparecida Penariol Natarelli e Roberta Vantini** pelo auxílio, boa convivência e amizade. Roberta..... minha grande amiga e peça “chave” durante a realização dos experimentos..... tenho uma imensa dívida de gratidão contigo!

À amiga **Clara Slade Oliveira**, por todo o auxílio durante a realização dos experimentos, apoio emocional e intelectual em momentos difíceis, e por sempre “embarcar” em minhas “viagens experimentais”..... pessoa extremamente inteligente e que muito admiro. Sentirei falta de nossas longas conversas amiga!

À amiga **Tatiane Almeida Drummond Tetzner**, que me acompanhou em grande parte de minha jornada pela Unesp de Jaboticabal..... sempre muito prestativa, extremamente educada e amável! Obrigada por todo o apoio querida!

À amiga **Marina Ragagnin de Lima**, que se mostrou sempre muito prestativa. Pessoa que levarei no coração. Muito obrigada por tudo guria!

Aos amigos de laboratório, **Adriana Santana, Aline Costa de Lucio, Ana Paula Perini, Danilas Salinet de Melo, Fabio Morato Monteiro, Jacqueline de Andrea Meirelles, Kellen de Sousa Oliveira, Letícia Zoccolaro de Oliveira, Marcos Brandão Dias Ferreira, Maria Carolina Villani Miguel, Maria Emília Franco Oliveira, Michely Fernandes de Macedo, Verônica Gonzáles Cadavid**, pela amizade, auxílio, companheirismo e troca de conhecimentos. Agradeço a oportunidade de encontrar pessoas maravilhosas como vocês...



Aos amigos que já não se encontram no Departamento de Reprodução Animal, mas que deixaram muitas saudades, **Andrea Cristina Basso, Christina Ramires Ferreira, Felipe Perecin, Letícia Barretto, Lorivaldo Paz Landim Junior, Marcela Maria de Souza, Max Vitória Resende, Mabel Freitas Cordeiro e Viviane Sgobbi Dias.**

**Aos “colegas de turma” Marcelo Barbosa Bezerra, Maricy Apparício Ferreira, Fernanda da Silva Gonçalves e Eveline dos Santos Zanetti.....** por todo o “apoio emocional” nos momentos críticos!

À colega **Lígia Garcia Mesquita**, que se prontificou em me ajudar nas análises do último experimento, com muita boa-vontade e paciência, e a todos os colegas de Pirassununga (USP), que muito contribuíram durante o período em que estive lá.

À **Profa. Luciana Correia de Almeida Regitano** e suas orientadas, “**Dri**” (**Adrina Ibelli**) e **Gisele Veneroni**, pela grande ajuda e disponibilidade durante o período em que estive na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos-SP).

Às amigas **Carla Braga Martins, Deborah Furlani Nascimbén, Daniela do Amaral Grossi e Raquel Mincarelli Albernaz** pela amizade, carinho, momentos de muita risada e incentivo que sempre me deram.

À **Daniele dos Santos Martins**, que conviveu bastante conosco no início do Mestrado, passou por várias “aventuras” comigo no “mundo dos pequenos animais” e se tornou uma grande amiga..... sinto tanta falta de você!!

À **Claudia Barbosa Fernandes**, pessoa pela qual tenho muito carinho e que me ensinou um pouquinho do “mundo dos equinos”..... gostaria de conviver bem mais contigo amiga!

A todos estagiários que passaram pelo DRA, pelo interesse e grande auxílio.

À **FAPESP**, fundamental para a realização de todos os trabalhos desenvolvidos desde o Mestrado.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal – UNESP**, em especial, ao **Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal** e à **Pós-graduação**, pelas instalações, condições de trabalho, acolhimento e oportunidade.

À minha linda família, por todo o amor, incentivo, compreensão, dedicação e entusiasmo transmitidos.

Ao meu namorado, que soube como ninguém o verdadeiro significado da palavra “paciência” ..... obrigada por tudo querido!

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização desse projeto, tanto com incentivo e auxílio, quanto com apoio e amizade.

## **APOIO FINANCEIRO**

Esse projeto foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, sob processos nº 06/51481-5 e nº 07/55969-5, no período entre dezembro de 2006 e fevereiro de 2010.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
ABREVIATURAS.....	xx
RESUMO.....	xxii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>03</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>05</b>
3.1. Maturação oocitária.....	05
3.2. Ciclo de divisão celular e controle exercido pelas cinases dependentes de ciclinas (CDKs).....	06
3.3. Importância do citoesqueleto na coordenação celular.....	09
3.4. Contextualização da clonagem de animais.....	11
3.4.1. Princípios da clonagem.....	11
3.4.2. Histórico .....	12
3.4.3. Aplicações da técnica de TN.....	13
3.4.4. Etapas envolvidas no processo de reconstituição embrionária por TN.....	15
3.4.4.1. Células doadoras de núcleo.....	15
3.4.4.2. Produção de citoplastos receptores.....	16
3.4.4.2.1. Enucleação química.....	19
3.4.4.3. Sincronização entre o ciclo celular da célula doadora de núcleo e do citoplasto receptor.....	21
3.4.4.4. Ativação artificial e cultivo <i>in vitro</i> dos embriões reconstituídos.....	24
3.4.5. Eficácia da clonagem .....	26

3.4.6. Reprogramação nuclear em clones.....	29
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
4.1. Obtenção e maturação de oócitos.....	36
4.2. Experimento I – Padronização das condições de cultivo em demecolcina de oócitos bovinos submetidos à EN química parcial e à EN química total.....	36
4.3. Experimento II – Dinâmica nuclear e de microtúbulos em oócitos ativados partenogeneticamente submetidos à EN química total.....	40
4.4. Experimento III – Avaliação de atividade do Fator Promotor de Maturação (MPF) e da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) em oócitos utilizados na EN química parcial e na EN química total.....	42
4.5. Experimento IV – Avaliação da eficiência de diferentes técnicas de enucleação oocitária, desenvolvimento inicial e expressão gênica em embriões reconstituídos por TN a partir de citoplastos oriundos de EN química.....	45
4.6. Análise Estatística .....	56
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
5.1. Experimento I – Padronização das condições de cultivo em demecolcina de oócitos bovinos submetidos à EN química parcial e à EN química total.....	58
5.1.1. Avaliação do tempo de incubação de oócitos em MII em demecolcina para a EN química parcial.....	58
5.1.2. Avaliação de diferentes condições de cultivo para a EN química total.....	60
5.1.3. Avaliação do tempo de incubação em demecolcina após 2 h da ativação para EN química total.....	64
5.2. Experimento II – Dinâmica nuclear e de microtúbulos em oócitos ativados partenogeneticamente submetidos à EN química total.....	65

5.3. Experimento III – Avaliação de atividade do Fator Promotor de Maturação (MPF) e da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) em oócitos utilizados na EN química parcial e na EN química total.....	69
5.4. Experimento IV – Avaliação da eficiência de diferentes técnicas de enucleação oocitária, desenvolvimento inicial e expressão gênica em embriões reconstituídos por TN a partir de citoplastos oriundos de EN química.....	76
5.4.1. Avaliação da eficiência de diferentes técnicas de enucleação: Convencional, EN química parcial e EN química total.....	76
5.4.2. Produção de embriões.....	77
5.4.3. Avaliação da expressão dos genes <i>XIST</i> , <i>G6PD</i> e <i>HSPA1</i> em blastocistos bovinos dos sexos feminino e masculino produzidos a partir de células doadoras embrionárias e citoplastos obtidos pelas técnicas de EN convencional, química parcial e química total.....	79
5.4.4. Avaliação da expressão dos genes <i>XIST</i> , <i>G6PD</i> e <i>HSPA1</i> em blastocistos bovinos do sexo feminino produzidos por transferência nuclear a partir de células doadoras adultas e citoplastos obtidos pelas técnicas de enucleação convencional e assistida quimicamente.....	83
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>104</b>
<b>8. IMPLICAÇÕES.....</b>	<b>105</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>106</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação relativa dos genes <i>XIST</i> , <i>G6PD</i> e <i>HSPA1A</i> e códigos de acesso no GenBank.....	54
<b>Tabela 2.</b> Taxas de formação de protrusão (PR) (média $\pm$ dp) em oócitos bovinos em MII expostos a 0,05 $\mu$ g/mL de demecolcina por 0,25 h; 0,5 h; 1,0 h; 1,5 h e 2,0 h. CON – grupo controle; DEME – grupo tratado pela demecolcina.....	59
<b>Tabela 3.</b> Taxa de oócitos em metáfase II (MII), ativados (com presença do 2 <sup>o</sup> CP) e enucleados (EN) no grupo controle (CON), após ativação (ATIV) com 5 $\mu$ M de ionomicina por 5 min e 10 $\mu$ g/mL de cicloheximide ou ativação e exposição à demecolcina (DEME) por 0, 4 e 5 horas.....	61
<b>Tabela 4.</b> Taxa de oócitos ativados após incubação em meio contendo 5 $\mu$ M de ionomicina por 5 min e 10 $\mu$ g/mL de cicloheximide por 4 h e diferentes tempos de tratamentos com demecolcina (DEME): Grupo 1 (DEME 0 h – 2 h); Grupo 2 (DEME 0 h – 4 h); Grupo 3 (DEME 0,5 h – 2,5 h); Grupo 4 (DEME 0,5 h – 4 h); Grupo 5 (DEME 1 h – 3 h); Grupo 6 (DEME 1 h – 4 h); Grupo 7 (DEME 1,5 h – 3,5 h); Grupo 8 (DEME 1,5 h – 4 h); Grupo 9 (DEME 2 h – 4 h). CON – controle; ATIV – ativado.....	62
<b>Tabela 5.</b> Taxas de enucleação (EN) de oócitos bovinos ativados por 2,0 h e expostos em seguida à 0,05 $\mu$ g/mL de demecolcina por 0,25 h; 0,5 h; 1,0 h; 1,5 h e 2,0 h, em combinação ao agente de ativação ciclohexemide. CON – grupo controle; DEME – grupo tratado pela demecolcina.....	64
<b>Tabela 6.</b> Porcentagem de diferentes estádios nucleares (oócitos imaturos, maduros ou ativados) em grupo tratado com demecolcina (Deme) por 2 h e nos grupos Controle e Ativado em intervalos de 0,5 h e 1,0 h entre 0 h (MII) e 10 h após o início da ativação. O sinal * indica exposição à demecolcina.....	67
<b>Tabela 7.</b> Porcentagem de diferentes configurações de microtúbulos (presentes, reduzidos ou ausentes) em grupo tratado com demecolcina (grupo Deme) e nos grupos Controle e Ativado em intervalos de 0,5 h e 1,0 h entre 0 h (MII) e 10 h após o início da ativação. O sinal * indica exposição à demecolcina.....	69

<b>Tabela 8.</b> Porcentagem de atividade média do Fator Promotor de Maturação (MPF) ao longo do período de tratamento com a demecolcina na técnica de EN parcial (grupo tratado).....	71
<b>Tabela 9.</b> Porcentagem de atividade média da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) ao longo do período de tratamento com a demecolcina na técnica de EN parcial (grupo tratado).....	72
<b>Tabela 10.</b> Porcentagem de atividade média do MPF ao longo do período de ativação e tratamento com a demecolcina (DEME) na técnica de EN total.....	74
<b>Tabela 11.</b> Porcentagem de atividade média da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) ao longo do período de ativação e tratamento com a demecolcina (DEME) na técnica de EN total.....	75
<b>Tabela 12.</b> Eficiência do processo de enucleação (EN) em oócitos bovinos submetidos à técnica convencional (EN CONV) e às técnicas de enucleação química parcial (EN PARCIAL) e total (EN TOTAL).....	76
<b>Tabela 13.</b> Quantidade de estruturas reconstituídas, e taxas (%) de fusão e lise em oócitos bovinos submetidos ao procedimento de transferência nuclear após realização das técnicas de enucleação convencional, parcial e total.....	78
<b>Tabela 14.</b> Número e porcentagem de estruturas clivadas e de blastocistos dos sexos feminino (F) e masculino (M) produzidos por TN a partir de células doadoras embrionárias, após realização das técnicas de enucleação convencional (EN Conv), parcial (EN Parcial) e total (EN Total) em bovinos.....	78
<b>Tabela 15.</b> Avaliação da taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto em embriões bovinos reconstituídos com células somáticas por TN após procedimentos de enucleação convencional e enucleação química parcial (SARAIVA et al., 2009).....	83



## LISTA DE FIGURAS

	Página
<p><b>Figura 1.</b> Fotomicrografias de oócitos bovinos ativados tratados com demecolcina (Avaliação da dinâmica nuclear). Categorias de oócitos encontradas: (a) oócito em metáfase I (MI), (b) oócito em metáfase II (MII), (c) oócito em anáfase/telófase II (AII/TII). Oócitos corados com Hoechst 33342 e observados em microscópio de epifluorescência. As setas indicam material nuclear (azul). As barras indicam 50µm.....</p>	41
<p><b>Figura 2.</b> Fotomicrografias de oócitos bovinos ativados tratados com demecolcina (Avaliação da configuração de microtúbulos). Categorias de oócitos encontradas: (a) oócito com microtúbulos (MTs) presentes, (b) oócito com MTs reduzidos, (c) oócito com ausência de MTs. Oócitos corados com anticorpo anti-<math>\alpha</math> tubulina (1:50) conjugado a FITC, observados em microscópio de epifluorescência. As setas indicam microtúbulos (verde). As barras indicam 50µm.....</p>	41
<p><b>Figura 3.</b> Modelo esquemático para obtenção dos grupos referentes à técnica A (EN Parcial) – oócitos em MII e após 0,5 h; 1,0 h; 2,0 h; 4,0 h e 8,0 h do início da exposição à demecolcina e dos grupos referentes à técnica B (EN Total) – oócitos em MII e após 0,5 h; 1,0 h; 2,0 h; 3,0 h; 4,0 h e 8,0 h do início da ativação, sendo o tratamento com demecolcina aplicado entre 2 e 4 h do processo de ativação. (C) – controle; (A) – ativado; (D) – exposto à demecolcina.....</p>	44
<p><b>Figura 4.</b> Exemplo de curva de regressão linear utilizando o programa LinReg para cálculo das eficiências individuais das reações de PCR. Os pontos incluídos entre os limites superior e inferior da janela de linearidade foram utilizados nos cálculos da eficiência e da correlação da curva.....</p>	55
<p><b>Figura 5.</b> Exemplo de curvas de amplificação por PCR em tempo real e linha de “threshold”, que corresponde ao ponto médio da janela de linearidade (região de amplificação exponencial). O ponto em que as curvas de amplificação cruzam a linha de “threshold” corresponde ao ciclo do “threshold” (Ct).....</p>	56
<p><b>Figura 6.</b> Fotomicrografias de oócitos bovinos tratados em MII com demecolcina, apresentando formação de protrusão na região cortical. Presença do 1º CP e protrusão (indicada pela seta), observados com (A) ou sem fluorescência (B). Aumento 200X.....</p>	59
<p><b>Figura 7.</b> Fotomicrografias de oócitos bovinos ativados tratados com demecolcina, apresentando enucleação completa e submetidos à coloração com Bisbenzímide (Hoechst 33342), observados com (A) ou sem fluorescência (B). Aumento 200X....</p>	63

**Figura 8.** Representação gráfica da porcentagem de oócitos enucleados (EN) após ativação com 5 $\mu$ M de ionomicina por 5 min e 10  $\mu$ g/mL de cicloheximide por até 4 h e diferentes tratamentos com demecolcina (DEME): Grupo 1 (DEME 0 – 2 h); Grupo 2 (DEME 0 – 4 h); Grupo 3 (DEME 0,5 – 2,5 h); Grupo 4 (DEME 0,5 – 4 h); Grupo 5 (DEME 1 – 3 h); Grupo 6 (DEME 1 – 4 h); Grupo 7 (DEME 1,5 – 3,5 h); Grupo 8 (DEME 1,5 – 4 h); Grupo 9 (DEME 2 – 4 h). <sup>a,b,c,d</sup>Colunas com sobrescritos diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). CON – controle; ATIV – ativado... 63

**Figura 9.** Representação gráfica da dinâmica nuclear em oócitos bovinos ativados expostos à demecolcina, avaliados em intervalos de 0,5 h e 1,0 h entre 0 h e 10 h após o início da ativação. Grupos avaliados: Controle (sem ativação e tratamento com demecolcina); Ativado (exposto apenas aos agentes ativadores) e Deme (ativado e submetido ao tratamento com demecolcina por 2 h), sendo representados em (A) oócitos imaturos, em (B) oócitos maduros e em (C) oócitos ativados. O sinal \* indica exposição à demecolcina..... 66

**Figura 10.** Representação gráfica da dinâmica de microtúbulos em oócitos bovinos ativados expostos à demecolcina, avaliados em intervalos de 0,5 h e 1,0 h entre 0 h e 10 h após o início da ativação. Grupos avaliados: Controle (sem ativação e tratamento com demecolcina); Ativado (exposto apenas aos agentes ativadores) e Deme (ativado e submetido ao tratamento com demecolcina por 2 h), sendo representados em (A) oócitos com MTs presentes, em (B) oócitos com MTs reduzidos e em (C) oócitos com MTs ausentes. O sinal \* indica exposição à demecolcina..... 68

**Figura 11.** Representação do ensaio da histona H1 (peso molecular de 35 KDa), marcando a atividade de MPF, e da proteína MBP (peso molecular de 20,4 KDa), marcando a atividade da MAPK, em gel de poliacrilamida a 15%. (A) Gel obtido de amostras destinadas à técnica de EN parcial (oócitos em MII expostos à demecolcina) e (B) Gel obtido de amostras destinadas à técnica de EN total (oócitos ativados expostos à demecolcina). C – controle, A – ativado, D – demecolcina..... 70

**Figura 12.** Representação gráfica do comportamento do Fator Promotor de Maturação (MPF) ao longo do período de tratamento com a demecolcina na técnica de EN parcial (A). Deme – tratado com demecolcina. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ )..... 72

**Figura 13.** Representação gráfica do comportamento da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) ao longo do período de tratamento com a demecolcina na técnica de EN parcial (A). Deme – tratado com demecolcina..... 73

- Figura 14.** Representação gráfica do comportamento do Fator Promotor de Maturação (MPF) ao longo do período de ativação e tratamento com a demecolcina na técnica de EN total (B). Ativado – grupo controle ativado; Deme – exposto à demecolcina entre 2 e 4 h de ativação. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ )..... 74
- Figura 15.** Representação gráfica do comportamento da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) ao longo do período de ativação e tratamento com a demecolcina na técnica de EN total (B). (A) – controle ativado; (D) – exposto à demecolcina entre 2 e 4 h de ativação. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ )..... 75
- Figura 16.** Representação gráfica da eficácia da enucleação (EN) após realização da técnica convencional e das técnicas com exposição à demecolcina (EN Parcial e EN Total). Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ )..... 77
- Figura 17.** Razão de expressão para o gene *XIST* em blastocistos bovinos dos sexos feminino (F) e masculino (M) obtidos por TN a partir de células doadoras embrionárias, após realização das técnicas de enucleação convencional (EN conv), parcial (EN parc) ou total (EN total), e em embriões produzidos *in vitro*, *in vivo* e por ativação partenogenética (Parteno). Grupo de referência = *In vitro* F..... 80
- Figura 18.** Razão de expressão para o gene *G6PD* em blastocistos bovinos dos sexos feminino (F) e masculino (M) obtidos por TN a partir de células doadoras embrionárias, após realização das técnicas de enucleação convencional (EN conv), parcial (EN parc) ou total (EN total) e reconstituídos com células embrionárias, e em embriões produzidos *in vitro*, *in vivo* e por ativação partenogenética (Parteno). Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Grupo de referência = *In vitro* F..... 81
- Figura 19.** Razão de expressão para o gene *HSPA1A* em blastocistos bovinos dos sexos feminino (F) e masculino (M) obtidos por TN a partir de células doadoras embrionárias, após realização das técnicas de enucleação convencional (EN conv), parcial (EN parc) ou total (EN total) e reconstituídos com células embrionárias, e em embriões produzidos *in vitro*, *in vivo* e por ativação partenogenética (Parteno). Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Grupo de referência = *In vitro* F..... 82
- Figura 20.** Expressão relativa de transcritos do gene *XIST* em blastocistos bovinos produzidos por fecundação *in vitro* (*In vitro*), ativação partenogenética (Parteno) e por TN a partir de células doadoras somáticas, após enucleação convencional (EN conv) ou química parcial (EN parcial). Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Grupo referência = *In vitro* F..... 84

**Figura 21.** Expressão relativa de transcritos do gene *G6PD* em blastocistos bovinos produzidos por fecundação *in vitro*, ativação partenogenética e por TN a partir de células doadoras somáticas, após enucleação convencional (EN conv) ou química parcial (EN parcial). Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Grupo referência = *In vitro* F..... 85

**Figura 22.** Expressão relativa de transcritos do gene *HSPA1A* em blastocistos bovinos produzidos por fecundação *in vitro*, ativação partenogenética e por TN a partir de células doadoras somáticas, após enucleação convencional (EN conv) ou química parcial (EN parcial). Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Grupo referência = *In vitro* F..... 85

## ABREVIATURAS

AI/TI	Transição Anáfase/Telófase I
AII/TII	Transição Anáfase/Telófase II
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
BSA	Albumina Sérica Bovina
° C	Graus Celsius
CDKs	Cinases Dependentes de Ciclinas
cDNA	DNA complementar
CIX	Centro de Inativação do X
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CP	Corpúsculo Polar
CpG	“Cytosine-phosphate diester-Guanine”
CSF	Fator Citostático
Ct	Ciclo do “threshold”
DEPC	Dietilpirocarbonato
6-DMAP	6-Dimetilaminopurina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Trifosfato de desoxinucleosídeos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EM	Enucleação
EN CONV	Enucleação convencional
EN PARCIAL	Enucleação parcial
EN TOTAL	Enucleação total
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GV	Vesícula Germinativa
GVBD	Ruptura da Vesícula Germinativa
<i>G6PD</i>	“glucose-6-phosphate dehydrogenase”
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HSOF	Meio SOF com Tampão Hepes
<i>HSPA1A</i>	“Heat shock 70 kDa protein 1”
IA	Inseminação artificial
IM	Intramuscular
LH	Hormônio Luteinizante
LOS	“Large offspring syndrome”
M	Molar
MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitógeno
MBP	“Myelin Basic Protein”
MF	Microfilamento
MII	Metáfase da segunda divisão meiótica

MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MT	Microtúbulo
mg	Miligramas
mL	Mililitro
MLI	Meio de lavagem e incubação
mm	Milímetro
mM	Milimol
Mos	Produto do Proto-oncogene c-mos
MPF	Fator Promotor de Maturação
PBS	Tampão Salina Fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PR	Protrusão
REST	“Relative Expression Software Tool”
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucléico Mensageiro
ROX	Fluorocromo carboxi-X-rodamina
RT-PCR	Transcrição Reversa por PCR
SAS	“Statistical Analysis System”
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Fluido Sintético de Oviduto
TALP	“Tyrode’s Albumin Lactate and Pyruvate”
TCM	“Tissue Culture Medium”
TN	Transferência Nuclear
UV	Ultravioleta
XIST	“X-Inactivate Specific”
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µM	Micromol
µseg	Microsssegundo

## CITOPLASTOS RECEPTORES PRODUZIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS DE ENUCLEAÇÃO NA TRANSFERÊNCIA NUCLEAR EM BOVINOS

**RESUMO** – Uma das etapas mais críticas do procedimento de transferência nuclear (TN) é a remoção da cromatina do oócito para a produção de citoplastos. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de diferentes ambientes citoplasmáticos obtidos a partir de três técnicas de enucleação (convencional, assistida quimicamente e induzida quimicamente) sobre o remodelamento nuclear e desenvolvimento embrionário, avaliando-se o perfil de expressão dos genes *XIST*, *G6PD* e *HSPA1A* em embriões bovinos. Para isso, quatro experimentos foram delineados. No primeiro experimento, verificou-se que o processo de enucleação pode ser iniciado a partir de 1,0 h de tratamento com demecolcina nas duas técnicas de enucleação química. A dinâmica nuclear e de microtúbulos de oócitos ativados tratados com demecolcina foi avaliada em um segundo experimento, e oócitos tratados apresentaram redução da densidade dos microtúbulos, porém, essas estruturas não desapareceram completamente na maioria dos oócitos. No experimento III, a demecolcina não apresentou efeitos significativos na atividade do fator promotor de maturação (MPF) e da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) quando utilizada na concentração 0,05µg/mL. No último experimento, a demecolcina não prejudicou o desenvolvimento embrionário e também não alterou o perfil de expressão dos genes *XIST*, *G6PD* e *HSPA1A* em embriões reconstituídos com células embrionárias; porém, quando foram avaliados os níveis de transcritos desses genes em embriões reconstituídos com células somáticas, observou-se maior expressão relativa do *XIST* e do *G6PD* em embriões oriundos da técnica de enucleação assistida quimicamente em comparação aos embriões produzidos pela técnica convencional. Portanto, conclui-se que a enucleação química não altera a reprogramação nuclear nem o desenvolvimento embrionário quando são utilizadas células doadoras embrionárias no procedimento de TN. Ainda, a técnica de enucleação assistida quimicamente promove incrementos na expressão dos genes *XIST* e *G6PD* quando são utilizadas células somáticas, mostrando que o uso da demecolcina é uma importante ferramenta no procedimento de transferência nuclear.

**Palavras-chave:** demecolcina, embrião, enucleação química, expressão gênica.

## RECIPIENT CYTOPLASTS PRODUCED BY DIFFERENT ENUCLEATION TECHNIQUES FOR BOVINE NUCLEAR TRANSFER

**ABSTRACT** - Removal of the oocyte chromatin for production of cytoplasts is one of the most critical steps of the standard nuclear transfer (NT) procedure. The aim of this work was to study the effect of different cytoplasmic environments from three enucleation techniques (conventional, chemical-assisted, and chemical-induced enucleation) on nuclear reprogramming and embryonic development, evaluating the expression patterns of *XIST*, *G6PD* and *HSPA1A* genes in bovine embryos. Therefore, four experiments were designed. In the first experiment, it was verified that the enucleation procedure can be initiated 1.0 h after starting demecolcine treatment on both chemical enucleation techniques. The nuclear and microtubular dynamics of activated oocytes treated with demecolcine were evaluated in a second experiment, and treated oocytes showed decreased microtubule density, but these structures did not completely disappear in most oocytes. In experiment III, demecolcine at a concentration of 0.05 $\mu$ g/mL had no significant effect on maturation promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) activity. In the last experiment, demecolcine had no detrimental effects on embryonic development. Also, the expression patterns of *XIST*, *G6PD* and *HSPA1A* were not altered in reconstituted embryos derived from embryonic donor cells; however, evaluation of transcript levels of these genes in embryos reconstituted using somatic donor cells revealed higher relative expression of *XIST* and *G6PD* in embryos derived from chemical-assisted enucleation in comparison to embryos those produced by the conventional technique. In conclusion, chemical enucleation has no effect on nuclear reprogramming and embryonic development after nuclear transfer using embryonic donor cells. Also, chemical-assisted enucleation increases *XIST* and *G6PD* expression in nuclear transfer embryos using somatic donor cells, showing that demecolcine is an important tool for nuclear transfer procedure.

**Keywords:** demecolcine, embryo, chemical enucleation, gene expression.



## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve grande evolução da tecnologia de transferência nuclear (TN), que possibilita a obtenção de indivíduos geneticamente idênticos. A produção de clones é de grande interesse tanto para a comunidade científica quanto para a indústria. O crescente interesse por essa biotécnica pode ser explicado por sua gama de aplicações, não só no melhoramento genético, com a multiplicação de indivíduos superiores, mas na propagação de indivíduos modificados geneticamente, na preservação de espécies ameaçadas de extinção e na biomedicina, pela possibilidade de produção de órgãos e tecidos (clonagem terapêutica), além de várias outras aplicações no campo da pesquisa básica.

Dois componentes celulares são essenciais para a produção de um clone: o núcleo doador (carioplasto) e o oócito enucleado receptor (citoplasto), cuja constituição citoplasmática deve ser suficientemente competente para permitir a reprogramação do núcleo transferido e dar suporte ao desenvolvimento embrionário, fetal e do indivíduo.

O procedimento de enucleação (EN) na TN tradicional é invasivo, e envolve a coloração do núcleo e exposição à irradiação UV, provocando alterações de membrana e componentes intracelulares dos oócitos (SMITH, 1993). A injúria causada ao oócito receptor durante o procedimento de enucleação convencional é agravada pela remoção de grande volume de citoplasma, que contém RNAm, proteínas e precursores moleculares essenciais ao desenvolvimento inicial até a ativação do genoma embrionário (BARNES e EYESTONE, 1990).

Assim, procedimentos alternativos que facilitam o processo de enucleação têm sido relatados. A enucleação química é uma técnica não-invasiva, muito atrativa por causar mínima diminuição do volume citoplasmático. Duas técnicas de enucleação química têm apresentado resultados animadores no contexto científico. Na primeira técnica, denominada EN química parcial (YIN et al., 2002a,b; GASPARRINI et al., 2003; LI et al., 2004; VAJTA et al., 2004; SARAIVA et al., 2009), é induzida a formação de uma protrusão na região cortical do oócito em MII, contendo toda a cromatina, que é retirada com auxílio de micromanipulação. Na segunda técnica, conhecida como EN química total (BAGUISI e OVERSTROM, 2000; GASPARRINI et al., 2002, 2003;

IBÁÑEZ et al., 2002, 2003; YIN et al., 2002a; FISCHER RUSSEL et al., 2005), oócitos ativados artificialmente são tratados com agentes desestruturadores de microtúbulos, com o objetivo de expulsar todo o material nuclear junto ao segundo corpúsculo polar (CP), a princípio, sem micromanipulação.

Embora existam vários relatos de avanços na clonagem nos últimos anos, verifica-se ainda baixa eficiência desse procedimento. A baixa viabilidade dos embriões clonados é principalmente expressa pela redução na taxa de implantação, pelo aumento na taxa de mortalidade fetal e perinatal, e pelas diversas anomalias observadas nos animais recém-nascidos. A possível causa para esse sucesso limitado da clonagem é a incorreta reprogramação do núcleo em embriões reconstituídos. No embrião clonado, a reprogramação nuclear ocorre em ambiente celular totalmente diferente e em curto período de tempo, correspondente ao intervalo entre a fusão do núcleo ao citoplasto e a ativação do genoma embrionário.

Além da influência do tipo de célula doadora de núcleo e da qualidade do citoplasto, a sincronização entre essas duas estruturas é de fundamental importância dentro do contexto da reprogramação nuclear. Embora existam evidências de que a utilização de citoplastos em metáfase II, com alta atividade do fator promotor da fase M (MPF), proporcione melhor reprogramação nuclear (TANI e TSUNODA, 2001), não se pode descartar a possibilidade do uso de citoplastos com baixos níveis de MPF na clonagem, uma vez que já foi demonstrada sua viabilidade, com a produção de clones a termo (BAGUISI et al., 1999).

Existem controvérsias na literatura quanto à real necessidade de exposição do núcleo doador ao MPF e à capacidade do citoplasma do oócito em remodelar a estrutura da cromatina e reprogramar o núcleo de modo apropriado. Assim, tivemos como proposta neste trabalho, estudar diferentes ambientes citoplasmáticos a partir de citoplastos bovinos oriundos de três técnicas de enucleação: convencional e EN química parcial, nas quais os oócitos possuem alta atividade do MPF, e EN química total, em que oócitos com baixa atividade do MPF são utilizados, sobre o remodelamento nuclear e posterior desenvolvimento embrionário.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

- Estudar diferentes metodologias para a produção de citoplastos com alta e baixa atividade de MPF, e seus efeitos na reprogramação nuclear da célula doadora em procedimentos de transferência nuclear e no desenvolvimento embrionário inicial em bovinos.

### 2.2. Específicos

- Padronizar as condições de cultivo com demecolcina em oócitos bovinos expostos à droga em metáfase II (EN química parcial) e após o processo de ativação (EN química total);
- Avaliar a dinâmica nuclear e o comportamento de microtúbulos em oócitos bovinos ativados submetidos à EN química total;
- Comparar a atividade do fator promotor da fase M (MPF), avaliado indiretamente pelo ensaio da histona H1, e da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), avaliada indiretamente pela proteína básica de mielina, entre oócitos submetidos à EN química parcial e à EN química total;
- Comparar a eficiência entre diferentes técnicas de EN (convencional, parcial e total), o desenvolvimento até o estágio de blastocisto após TN e a expressão relativa dos genes *XIST*, *G6PD* e *HSPA1A* em embriões bovinos dos sexos feminino e masculino, reconstituídos com células doadoras embrionárias;

- Avaliar a expressão relativa dos genes *XIST*, *G6PD* e *HSPA1A* em embriões bovinos no estágio de blastocisto produzidos a partir das técnicas de EN convencional e química parcial e reconstituídos com células doadoras somáticas.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Maturação oocitária

Após o processo de crescimento celular e redistribuição das organelas citoplasmáticas, as células germinativas primordiais multiplicam-se ativamente no ovário e são transformadas em oogônias. Ao final da vida pré-natal, os oócitos entram no estágio de diplóteno da prófase I, no qual permanecem até próximo à ovulação, quando retomam a meiose (GORDON, 1994).

Um importante aspecto do crescimento oocitário é o acúmulo de RNAs no citoplasma. Esse “pool” de RNAm estocado é essencial para assegurar a apropriada síntese protéica durante o silenciamento transcricional do genoma embrionário bovino, que ocorre durante a maturação meiótica, fertilização e as primeiras divisões embrionárias. Em adição aos RNAm, as proteínas acumuladas durante o crescimento oocitário também são muito importantes para a retomada da meiose (ROBERT et al., 2002).

Uma vez que o oócito é retirado do ambiente folicular, a retomada da meiose é seguida por um período latente durante o qual o fator promotor da fase M (MPF), um complexo protéico composto de duas subunidades, a ciclina B e a proteína p34<sup>cdc2</sup>, é ativado. Portanto, a habilidade do oócito em retomar a meiose está associada com a atividade do MPF, que apresenta algumas diferenças espécie-específicas (YAMASHITA et al., 2000).

Dessa maneira, a maioria dos oócitos de anfíbios e mamíferos que se apresentava estacionada no estágio de vesícula germinativa (VG) da prófase da primeira divisão meiótica, sob estímulo apropriado, retoma o processo da meiose, com quebra da vesícula germinativa, condensação cromossômica e rearranjo da rede de microtúbulos, eventos necessários para que seja alcançado o estágio de metáfase da primeira divisão meiótica (MI). Os oócitos então progridem para os estádios de anáfase I e telófase I, sem qualquer descondensação detectável dos cromossomos, alcançando a metáfase da segunda divisão meiótica (MII), estágio no qual estacionam novamente.

A retomada e finalização da segunda divisão meiótica ocorrem apenas após o processo de fecundação ou ativação partenogenética (ROBERT et al., 2002).

Após a fecundação ou ativação artificial, a segunda divisão meiótica é completada, com a extrusão do segundo corpúsculo polar. As cromatinas feminina e masculina descondensam-se e dois pronúcleos são formados, nos quais tem início a replicação do DNA. Posteriormente, os pronúcleos unem-se e ocorre a segregação do material genético por meio de mitose, com a clivagem do zigoto em dois blastômeros (CAMPBELL et al., 1996).

### **3.2. Ciclo de divisão celular e controle exercido pelas cinases dependentes de ciclinas (CDKs)**

Em espécies unicelulares, tais como bactérias e leveduras, cada divisão celular produz um organismo adicional. Em espécies multicelulares, diversos ciclos de divisão celular são requeridos, inclusive no indivíduo adulto, para substituição de células danificadas, funcionalmente deficientes ou perdidas por morte celular programada (ALBERTS et al., 2002).

A meiose é um exemplo particular da divisão celular que ocorre nas células germinativas. Trata-se de um ciclo celular especializado, que consiste em duas etapas sucessivas de segregação cromossômica seguintes a um ciclo de replicação de DNA (DEKEL, 1995).

Os ciclos de divisão eucariótica mais curtos conhecidos são os ciclos de células embrionárias nos estádios iniciais. Não ocorre crescimento algum durante esses ciclos, e as fases  $G_1$  e  $G_2$  estão drasticamente encurtadas (ALBERTS et al., 2002), sendo que a maioria dos núcleos celulares apresenta-se na fase de síntese de DNA – fase S (CAMPBELL et al., 1993).

Uma complexa série de processos nucleares e citoplasmáticos ocorre durante o ciclo celular, exigindo perfeita coordenação entre eles. O ciclo celular é subdividido nas fases  $G_1$ , S,  $G_2$  e M, sendo que a replicação do DNA nuclear ocupa somente uma parte da intérfase, chamada fase S do ciclo celular. O intervalo entre o término da mitose e o início da síntese de DNA é chamado de fase  $G_1$ , enquanto o intervalo entre o final da

síntese de DNA e o início da mitose é chamado de fase G<sub>2</sub>. As fases G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> propiciam tempo adicional para o crescimento celular, e células em G<sub>1</sub>, ainda não comprometidas com a replicação de DNA, podem interromper seu crescimento durante o ciclo e passar para um estado especializado de repouso, chamado de G<sub>0</sub>, no qual podem permanecer por dias, semanas ou mesmo anos antes de retornar a proliferar (ALBERTS et al., 2002).

Dentre os reguladores do ciclo celular, as cinases dependentes de ciclinas (CDKs) exercem papel central no início e na ordenação dos eventos de divisão celular, regulando a progressão das fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M (KNOCKAERT et al., 2002). A família das proteínas cinases dependentes de ciclina ativa processos que requerem a fosforilação de serinas e treoninas em proteínas-alvo apropriadas. A formação, ativação e separação dos complexos ciclina-CDK são eventos fundamentais que coordenam o ciclo celular (ALBERTS et al., 2002).

As principais mudanças que ocorrem durante a maturação oocitária de várias espécies são acompanhadas por mudanças nos processos de fosforilação protéica. A ativação das duas principais cinases envolvidas na fase M, denominadas MPF e MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno) está correlacionada a essa alteração no estado de fosforilação (ROBERT et al., 2002).

O MPF é um dímero protéico formado pela ciclina B1 (subunidade regulatória) e pela proteína p34<sup>cdc2</sup> (subunidade catalítica) (YANG et al., 1994; HOMA, 1995; SUN et al., 2002), que promove fosforilação das lamínas, que são as proteínas que compõem a lâmina nuclear, com conseqüente ruptura do envelope nuclear, além de levar à fosforilação das histonas, o que desencadeia a condensação cromossômica.

A ativação do MPF ocorre em dois níveis. Primeiramente, há associação da proteína p34<sup>cdc2</sup> com a subunidade regulatória ciclina B, que por sua vez, foi sintetizada e acumulada durante a intérfase. O segundo nível de ativação é a fosforilação e desfosforilação de diferentes locais da própria cinase p34<sup>cdc2</sup>. O MPF é ativado pela fosforilação na treonina (Tre) 161 e desfosforilação na Tre 14 e tirosina (Tir) 15 da Cdc2 pela enzima fosfatase cdc25. Como consequência, a ativação do MPF promove a transição de G<sub>2</sub> para a fase M na progressão do ciclo celular (QIU et al., 2008).

Adicionalmente, pelo menos dois tipos de ciclina B, a ciclina B1 (CB1) e a ciclina B2 (CB2) estão presentes nos vertebrados. Os complexos CB1/Cdc2 (CB1-MPF) e CB2/Cdc2 (CB2-MPF) foram sugeridos como tendo diferentes funções durante a gametogênese (QIU et al., 2008).

A fosforilação da Tre 161 é essencial para a ativação da Cdc2. Porém, nas fases S e G2, a atividade do MPF é inibida pela fosforilação dos resíduos da Tre 14 e Tir 15, que é catalisada pela Wee1 e proteínas cinases relacionadas (LEE et al., 1991; LUNDGREN et al., 1991). Na entrada da fase M, essa inibição é removida pela atividade da fosfatase Cdc25, e a Cdc2 é completamente desfosforilada, o que promove sua atividade máxima (LIN et al., 2006).

A ação da MAPK na regulação dos eventos do ciclo celular pode ser desvinculada à ação do MPF em oócitos mamíferos. A MAPK é ativada pela MAP cinase cinase (MAPKK ou MEK), que por sua vez, é regulada pela proteína Mos. Sun et al. (2002) mostraram que a habilidade do citoplasma oocitário em fosforilar a MAPK é um pré-requisito para a ocorrência da quebra da vesícula germinativa (GVBD).

As MAPKs também são denominadas cinases reguladas por sinal extracelular (ERKs), pelo fato de serem importantes intermediárias no mecanismo de sinalização, pelo qual um estímulo externo na superfície celular leva a mudanças no interior da célula. A ativação das MAPKs requer fosforilação nos resíduos tirosina e treonina por outra cinase identificada pela dupla especificidade, a MAPKK ou MEK (ZERNICCKA-GOETZ e MARO, 1993; SUN et al., 2001a).

A ativação dessas proteínas desencadeia a fosforilação de vários substratos, incluindo laminas nucleares (DESSEV et al., 1991), histona H1 (LANGAN et al., 1989), tubulina presente no fuso meiótico (VERDE et al., 1990), e proteínas associadas aos centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) (CENTONZE e BORISY, 1990; BUENDIA et al., 1992). A fosforilação catalisada pelo MPF e pela MAPK é tida como indutora da GVBD, que é um complexo evento que promove a ruptura do envelope nuclear e a condensação e individualização dos cromossomos (MOTLIK et al., 1996).

Além do MPF e da MAPK, outro fator importante para manutenção do oócito em meiose é o fator citostático (CSF ou Mos – produto do proto-oncogene c-mos), que por



sua vez, bloqueia a degradação da ciclina B, permitindo assim, a persistência do MPF (YANG et al., 1994; HOMA, 1995). Além disso, o CSF ativa a MAPK (HIRAO e EPPIG, 1997; LIU et al., 1998), que é responsável pela manutenção do fuso meiótico (VERLHAC et al., 1994).

Após a fecundação do oócito pelo espermatozóide ou ativação partenogênica com determinados agentes, ocorrem elevações transitórias e periódicas de cálcio livre intracelular (YANG et al., 1994), que resultam na indução da reação cortical, retomada da meiose e formação dos pronúcleos (KUPKER et al., 1998). Esse aumento do cálcio livre intracelular inativa o CSF e promove destruição da ciclina, resultando na inativação do MPF (WHITE e YUE, 1996) e permitindo a ocorrência, no oócito, dos eventos iniciais da ativação, que se dividem em nucleares: retomada da meiose, transição anáfase/telófase, extrusão do segundo corpúsculo polar, e citoplasmáticos: exocitose dos grânulos corticais, com conseqüente endurecimento da zona pelúcida e bloqueio à polispermia.

### **3.3. Importância do citoesqueleto na coordenação celular**

A capacidade das células eucarióticas em adotar uma variedade de formas e executar movimentos coordenados e direcionados depende de uma rede complexa de filamentos de proteínas, chamada de citoesqueleto, que se estende por todo o citoplasma da célula. O citoesqueleto depende basicamente de três tipos de filamentos protéicos: filamentos de actina (microfilamentos), microtúbulos e filamentos intermediários.

Os microtúbulos (MTs) são estruturas polares, que apresentam uma das extremidades ancorada no centrôssomo e a outra, livre no citoplasma. São altamente dinâmicos, podendo aumentar ou diminuir em comprimento pela adição ou perda de subunidades de tubulina. A polimerização e a despolimerização dos microtúbulos é um processo complexo, com funções biológicas importantes (ALBERTS et al., 2002).

A família das tubulinas compreende três tipos de polipeptídeos evolutivamente relacionados:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  tubulina. Os heterodímeros formados por  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina são os

principais componentes dos microtúbulos. Em contraste, a  $\gamma$  tubulina parece estar restrita aos pólos mitóticos (JULIAN et al., 1993).

Movimentos intracelulares periódicos observados nas células eucarióticas são gerados por proteínas motoras que se ligam tanto aos filamentos de actina como aos microtúbulos, como as miosinas, que se deslocam ao longo dos filamentos de actina, as cinesinas e as dineínas, que se movem em direção às extremidades dos microtúbulos (ALBERTS et al., 2002). Existem muitas situações nas quais os microtúbulos e os filamentos de actina atuam de modo coordenado. Ibáñez et al. (2003) mostraram que a interação dos microtúbulos com filamentos de actina no córtex celular media a rotação do fuso e coordena a cariocinese e citocinese.

Durante a maturação meiótica de oócitos em mamíferos, ocorrem várias mudanças nucleares e citoplasmáticas, incluindo quebra da vesícula germinativa, condensação dos cromossomos, extrusão de corpúsculo polar e formação do fuso meiótico, que estão associadas a alterações na organização de microtúbulos (MTs) e microfilamentos (MFs). A organização e desorganização desses componentes do citoesqueleto têm papel-chave na regulação da formação do fuso meiótico, no alinhamento e na segregação dos cromossomos, movimento do material nuclear de posição central para a região cortical e extrusão dos corpúsculos polares (LI et al., 2005). A formação e as mudanças morfológicas dos fusos dependem da atividade de MTs, MFs e proteínas motoras associadas aos cromossomos e MTs (BARTON e GOLDSTEIN, 1996; BRUNET e VERNOS, 2001; WITTMANN et al., 2001).

Os MTs não são observados nos estádios de vesícula germinativa (GV) e de rompimento da vesícula germinativa (GVBD) (KIM et al., 1996; LI et al., 2005). Porém, após a GVBD, os cromossomos se condensam e poucos MTs aparecem próximos à cromatina, tornando-se facilmente visíveis de metáfase I até os estádios tardios da meiose (LI et al., 2005). Em bovinos, os MTs e MFs muitas vezes são extrusos com o 1<sup>o</sup> e o 2<sup>o</sup> CP, sendo que esses ficam completamente rodeados por MTs, ao contrário de outras espécies, nas quais MTs não são observados no 1<sup>o</sup> CP (KIM et al., 1996; LEE et al., 2000; WANG et al., 2000; SUN et al., 2001b).

Na célula mitótica ou meiótica, o MPF pode induzir a reorganização de MTs que se apresentam em intérfase para uma configuração de metáfase (VERDE et al., 1992). A atividade do MPF diminui entre MI e MII, mas os microtúbulos mantêm a configuração de metáfase durante esse período. Verlhac et al. (1994) demonstraram, em murinos, que as mudanças na organização de MTs e na condensação de cromatina durante a meiose estão mais correlacionadas com a atividade da MAPK do que com o MPF, sendo que em suínos resultados semelhantes foram encontrados (KIM et al., 1996).

Já a saída da metáfase exige a destruição do MPF, pela degradação da subunidade regulatória ciclina B (WINSTON et al., 1995), e a destruição da ciclina, por sua vez, requer a presença de um fuso intacto (KUBIAK et al., 1993). Além do fuso intacto, deve ocorrer um pulso de cálcio para que ocorra a progressão dos oócitos estacionados em MII para o estágio de intérfase.

Os microtúbulos são estruturas altamente lábeis e, com isso, o fuso mitótico é alvo de uma variedade de drogas anti-mitóticas específicas, que interferem com a troca de subunidades de tubulina entre os microtúbulos e o “pool” de tubulina livre. Uma dessas drogas é a colchicina, sendo que cada molécula de colchicina liga-se firmemente a uma molécula de tubulina, impedindo sua polimerização. A exposição de uma célula em divisão à colchicina ou à demecolcina, que é uma droga com ação semelhante, causa o desaparecimento rápido do fuso mitótico, indicando que o equilíbrio químico é mantido por meio da troca constante de subunidades entre os microtúbulos do fuso e o “pool” de tubulina livre (ALBERTS et al., 2002).

### **3.4. Contextualização da clonagem de animais**

#### **3.4.1. Princípios da clonagem**

A palavra clone é originária do grego “*klôn*” e tem por significado “broto”. Inicialmente definida para representar as técnicas assexuadas de enxertia e brotamento para a multiplicação de plantas, a clonagem passou a ter outro significado com o aprimoramento das técnicas de manipulação de embriões. Em animais, a clonagem

pode ser definida como a produção de indivíduos geneticamente idênticos (HEYMAN e RENARD, 1996).

A clonagem por transferência nuclear (TN) está fundamentada nos princípios da equivalência nuclear, que é a conservação do genoma durante a diferenciação celular, e da plasticidade celular, propriedade que permite a uma célula ser reprogramada e ter a diferenciação celular redirecionada.

Clones são cópias genéticas nucleares, com possíveis variações epigenéticas, citoplasmáticas e fenotípicas (SMITH e MURPHY, 2004).

### **3.4.2. Histórico**

Speemann (1938) propôs inicialmente o conceito da “equivalência nuclear”, ou seja, que o núcleo de células diferenciadas teria a capacidade de iniciar e sustentar o desenvolvimento embrionário normalmente. Contudo, somente em 1952, Briggs e King demonstraram, em suas pesquisas com anfíbios (*Rana pipiens*), que o isolamento do núcleo de células embrionárias em blástula e sua introdução no interior do citoplasma de um zigoto previamente enucleado seria capaz de proporcionar o desenvolvimento embrionário normal até o estágio larval de girino.

O primeiro relato de mamíferos nascidos a partir de embriões reconstituídos foi descrito em camundongos por Illmensee e Hope (1981). A técnica envolvia o isolamento do núcleo de células da massa celular interna (MCI) e sua introdução direta no citoplasma de zigotos, que eram posteriormente enucleados. McGrath e Solter (1983) são considerados os pioneiros na reconstrução de embriões mamíferos utilizando o método denominado transferência nuclear (TN). Essa técnica envolve microcirurgia e fusão celular e não requer o isolamento e a injeção do núcleo no interior do citoplasma. Porém, o primeiro relato de um mamífero nascido a partir dessa técnica foi descrito somente em 1986, em ovinos, por Willadsen. Desde então, a TN vem sendo empregada com êxito em diversas outras espécies, como bovinos (PRATHER et al., 1987), caprinos (YONG e YUQIANG, 1998), coelhos (STICE e ROBL, 1988), suínos (PRATHER et al., 1989b), camundongos (CHEONG et al., 1983) e macacos (MENG et al., 1997).

O desenvolvimento da técnica de TN em mamíferos a partir de células embrionárias e o crescente interesse da indústria e dos centros de pesquisa na multiplicação de animais geneticamente idênticos fizeram com que novos estudos fossem realizados, utilizando-se células em estágio de diferenciação mais avançado. A possibilidade de estabelecimento e manutenção de culturas de células a serem utilizadas como fonte doadora de núcleo foi fundamental para o desenvolvimento da técnica descrita por Wilmut et al. (1997), que resultou no nascimento da ovelha “Dolly”, o primeiro clone produzido a partir de células somáticas diferenciadas obtidas de um animal adulto. Com base nesses resultados e observações, esses autores provocaram uma das maiores revoluções da ciência contemporânea e assim, além de responder ao questionamento de Speemann (1938), demonstraram a viabilidade da clonagem de indivíduos adultos para todo o mundo.

Desde então, a clonagem utilizando-se células somáticas adultas diferenciadas já foi relatada com êxito em diversas outras espécies, como em bovinos (KATO et al., 1998; YAMAZAKI et al., 2005), camundongos (WAKAYAMA et al., 1998), caprinos (BAGUISI et al., 1999; ZOU et al., 2001), suínos (BETTHAUSER et al., 2000; ONISHI et al., 2000; POLEJAEVA et al., 2000), gatos (SHIN et al., 2002; YIN et al., 2005), coelhos (CHESNE et al., 2002), ratos (ZHOU et al., 2003), mulas (WOODS et al., 2003), equinos (GALLI et al., 2003), cervídeos (BURKE, 2003), cães (LEE et al., 2005), ferrets (LI et al., 2006), búfalos (SHI et al., 2007) e lobos (KIM et al., 2007). Porém, a eficiência da clonagem ainda é extremamente baixa, pois é um processo que envolve complexa combinação de fatores tanto biológicos como técnicos que interagem entre si, muitos dos quais ainda não são compreendidos (WELLS et al., 1999).

### **3.4.3. Aplicações da técnica de TN**

A transferência nuclear é uma técnica com várias aplicações para seleção animal, produção de animais transgênicos, conservação de espécies ameaçadas de extinção e pesquisas relacionadas à diferenciação celular e interação núcleo-citoplasmática. Essa técnica é influenciada por vários fatores, como fonte da célula doadora de núcleo e estágio de diferenciação, número de repiques das células durante

o cultivo celular, estágio do ciclo celular, idade oocitária, métodos de ativação, enucleação e cultivo utilizados (LIU et al., 2000).

Além de contribuir com a ciência básica, permitindo melhor compreensão dos mecanismos genéticos e epigenéticos envolvidos na embriogênese, a clonagem apresenta importantes aplicações em estudos de diferenciação celular e na possibilidade de transplante de órgãos e tecidos, com as ferramentas da clonagem terapêutica e xenotransplantes (KIND e COLMAN, 1999; LANZA et al., 1999; CAMPBELL, 2002; NIEMANN et al., 2003).

Ainda, a clonagem pode ser usada comercialmente em rebanhos para produzir cópias genômicas de animais de alto mérito genético (GALLI et al., 1999; PATERSON et al., 2003; FABER et al., 2004) e tem sido usada na tentativa de preservação de espécies ameaçadas de extinção (WELLS et al., 1998; CORLEY-SMITH e BRANDHORST, 1999; WHITE et al., 1999; LOI et al., 2001). Porém, a grande aplicação da clonagem está aliada à modificação do núcleo doador para produção de animais transgênicos (CIBELLI et al., 1998; CHAN, 1999; PIEDRAHITA, 2000; POLEJAEVA et al., 2000).

Do ponto de vista de produção animal, o processo de clonagem só é justificado se os animais forem geneticamente superiores em algumas características para as quais foram selecionados (VAN VLECK, 1998). Atualmente, a clonagem está restrita a rebanhos de elite e animais com características especiais (MEIRELLES et al., 2007). Há necessidade de se ressaltar, que a passagem do material genético dos clones para seu ciclo germinal é suficiente para corrigir eventuais falhas epigenéticas, de modo que os gametas dos clones são geneticamente e epigeneticamente semelhantes aos gametas dos indivíduos originais (WELLS, 2005).

Um primeiro sinal de interesse comercial na produção de clones foi a divulgação de um relatório pelo “Food and Drug Administration – FDA”, afirmando, com base em uma série de estudos, que não há risco à saúde humana associado ao consumo de produtos derivados (carne e leite) de clones bovinos (TAKAHASHI e ITO, 2004; TIAN et al., 2005; HEYMAN et al., 2007; RUDENKO e MATHESON, 2007).

### **3.4.4. Etapas envolvidas no processo de reconstituição embrionária por TN**

A técnica de reconstituição por transferência nuclear envolve, basicamente, as seguintes etapas: obtenção das células doadoras de núcleo, obtenção de oócitos receptores, remoção da cromatina (enucleação), sincronização do ciclo celular entre célula doadora e citoplasto, introdução do núcleo doador no oócito receptor, ativação do oócito reconstituído, cultivo *in vitro* e inovulação dos embriões.

Como se trata de uma técnica relativamente complexa, com grande número de variações entre cada uma das etapas envolvidas, decorrentes de diferentes metodologias empregadas pelos diversos grupos de pesquisa, aliado ao fato de que existem diferenças espécie-específicas, há uma ampla variação dos resultados no que diz respeito ao desenvolvimento até o estágio de blastocisto (ROBL, 1999; WELL et al., 1999; WESTHUSIN et al., 2001).

#### **3.4.4.1. Células doadoras de núcleo**

Ampla variedade de tipos de células já foi empregada na clonagem, como por exemplo: células da glândula mamária (WILMUT et al, 1997), leucócitos (GALLI et al., 1999), linfócitos B e T (HOCHEDLINGER e JAENISCH, 2002), condrócitos (BEYHAN et al., 2000), células do *cumulus* (WAKAYAMA et al., 1998; TAMASHIRO et al., 2000), da granulosa (WELLS et al., 1999; POLEJAEVA et al., 2000), do oviduto (KATO et al., 1998), de Sertoli (OGURA et al., 2000), do fígado e uterinas (KATO et al., 2000), dentre outras (BREM e KUHHLZER, 2002; OBACK e WELLS, 2002). Entretanto, tem-se verificado diferenças quanto às taxas de desenvolvimento dos embriões reconstituídos de acordo com a célula doadora de núcleo utilizada (KATO et al., 2000), indicando que algumas células são mais facilmente reprogramadas do que outras.

O genoma da célula pode passar por modificações que interferem no êxito da técnica antes de sua utilização na reconstituição, tais como recombinação genética (HOCHEDLINGER e JAENISCH, 2002), mutações espontâneas, alteração de ploidia (KING et al., 2006), danos genéticos promovidos por estresse oxidativo e envelhecimento da cromatina. Essas modificações podem ser influenciadas pelas

condições de cultivo celular bem como pelo número de passagens das células (RENARD et al., 2002).

Sabe-se que quanto maior é o estágio de diferenciação celular, mais difícil e complexo é o processo de reprogramação do núcleo a um estágio embrionário de zigoto. Mas as razões para essas diferenças ainda não são conclusivas. Alguns estudos têm buscado alterar o estado epigenético da célula doadora de núcleo antes da reconstituição, por tratamentos químicos (ENRIGHT et al., 2003) e pela transferência da cromatina remodelada *in vitro* (SULLIVAN et al., 2004) sem obtenção de grandes avanços.

Na rotina laboratorial são utilizadas, principalmente, linhas celulares estabelecidas de fibroblastos oriundos de fragmentos de pele, devido à maior praticidade, possibilidade de clonagem tanto de machos como de fêmeas, condições de cultivo celular bem conhecidas, com produção de linhas primárias estáveis, homogêneas, de alta capacidade mitótica e resistentes ao processo de congelação (HEYMAN et al., 2000).

#### **3.4.4.2. Produção de citoplastos receptores**

De modo geral, tem-se utilizado no processo de reconstituição oócitos maturados *in vitro* em estágio de metáfase II. Nas espécies domésticas, principalmente em bovinos, devido à disponibilidade de ovários de abatedouro, usados nos procedimentos de fecundação *in vitro*, o emprego desse tipo de fonte doadora de citoplasma tem sido rotina na maioria dos laboratórios.

A heterogeneidade dos oócitos maturados *in vitro* é um ponto negativo para o uso de ovários de abatedouro, considerando as diferentes origens dos ovários, que podem ter influência sobre a competência oocitária (HAGEMANN, 1999) e, desse modo, interferir no processo de reprogramação nuclear. Em contrapartida, o uso de oócitos maturados *in vitro* oferece algumas vantagens técnicas, além de econômicas, incluindo a possibilidade de escolher o tempo de maturação (MIYOSHI et al., 2002) e usar oócitos em diferentes estágios do ciclo meiótico (MIYOSHI et al., 2001).



Para que o núcleo doador possa iniciar seu desenvolvimento no citoplasma, é necessária a prévia remoção do DNA dos oócitos. Esse processo, denominado de “enucleação oocitária”, é essencial na TN para a manutenção da correta ploidia do embrião. No procedimento convencional, a enucleação é realizada por microcirurgia utilizando-se oócitos em estágio de metáfase II, com aspiração, para o interior de uma micropipeta, do primeiro corpúsculo polar (CP) e de parte adjacente do citoplasma do oócito. Em camundongos e ratos, os cromossomos em MII são visíveis em microscópio óptico como uma área translúcida (FULKA et al., 2004), porém esse não é o caso de outras espécies de mamíferos como suínos, bovinos, ovinos e caprinos, nas quais em decorrência da maior taxa de lipídeos a visualização dos cromossomos dificilmente é possível sem a coloração do DNA (YIN et al., 2002b).

Desse modo, a maioria dos protocolos utiliza o corante específico de DNA, Hoechst 33342, o qual sob excitação à luz ultravioleta (UV), permite a visualização da cromatina e a confirmação da enucleação. Entretanto, a exposição à UV pode provocar danos aos oócitos e à membrana plasmática (SMITH, 1993), além de ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário (PRATHER et al., 1987).

Alguns laboratórios adotam a enucleação de oócitos em MII “às cegas”, guiando-se apenas pelo 1º CP, porém as taxas de enucleação não são muito altas devido ao deslocamento da cromatina presente no citoplasma do oócito em relação ao 1º CP no decorrer do tempo de maturação (BORDIGNON e SMITH, 1998; MOHAMED NOUR e TAKAHASHI, 1999).

A primeira tentativa de expansão das fronteiras convencionais foi a técnica descrita por Fulka e Moor (1993) de enucleação química oocitária não-invasiva, utilizando-se um inibidor de síntese protéica, o etoposídeo, em oócitos em MI para auxiliar no processo de enucleação durante a extrusão do primeiro corpúsculo polar.

Ainda, Tatham et al. (1995) desenvolveram uma nova técnica de enucleação oocitária, submetendo oócitos bovinos à centrifugação em um gradiente descontínuo de Percoll, para estratificação das organelas em vários graus de densidade dentro do citoplasma. Essa técnica também foi relatada por Wagoner et al. (1996) e por Savard et al. (2004) em suínos, que observaram diminuição na taxa de clivagem embrionária.

Outro método que tem sido considerado eficiente no preparo de citoplastos para a TN em bovinos é a enucleação em telófase (BORDIGNON e SMITH, 1998; MOHAMED NOUR e TAKAHASHI, 1999), que também já foi descrita em ovinos (PEURA e VAJTA, 2003) e camundongos (MUNSIE, 2002). A técnica consiste na ativação partenogenética de oócitos maduros e remoção do 2º CP junto com pequena quantidade de citoplasma ao redor, por meio de micromanipulação.

Como o fluorocromo Hoechst 33342 possui um comprimento de onda curto (excitação 350nm), acaba transferindo grande quantidade de energia ao material biológico sob excitação. Assim, Dominko et al. (2000) mostraram a possibilidade do uso de fluorocromos alternativos ao Hoechst 33342, com maior comprimento de onda, para coloração de cromatina (Sybr 14) e microtúbulos (tubulina conjugada à rodamina) em oócitos bovinos. Porém, não foram encontrados dados adicionais sobre a viabilidade de estruturas expostas a esses fluorocromos.

Oócitos livres de zona pelúcida (“zona free”) têm sido empregados com sucesso no procedimento de TN pela técnica de clonagem manual ou “Handmade Cloning” (VAJTA et al., 2001, 2003), que está baseada na bissecção de oócitos livres de zona pelúcida com o uso de microlâminas, sob um estereomicroscópio. Em seguida, os demi-oócitos são corados com Hoechst 33342 e expostos à irradiação UV, separando-se citoplastos de carioplastos. Essa técnica simplificada já foi relatada em suínos (KRAGH et al., 2005) e bovinos (VAJTA et al., 2001, 2003, 2004; BHOJWANI et al., 2005; PEDERSEN et al., 2005), inclusive permitindo o nascimento de bezerros saudáveis (TECIRLIOGLU et al., 2003; BARTELS et al., 2004).

Outra técnica de enucleação extremamente interessante é a técnica de enucleação induzida quimicamente de oócitos pré-ativados, que visa à extrusão de todo o material nuclear juntamente ao 2º CP, e que já foi descrita em murinos (BAGUISI e OVERSTROM, 2000; GASPARRINI et al., 2003; IBÁÑEZ et al., 2003), coelhos (YIN et al., 2002a), caprinos (IBÁÑEZ et al., 2002), ovinos (GASPARRINI et al., 2002) e bovinos (FISCHER RUSSEL et al., 2005). Quando compara-se a enucleação não-invasiva de oócitos em MI ou MII há uma marcante diferença. Enquanto no primeiro caso, o CP com todo o conteúdo nuclear é completamente liberado do oócito, no segundo caso o

contato entre o 2º CP e o citoplasma do oócito persiste, fornecendo dessa maneira, enucleação somente temporária (FULKA et al., 2004).

#### **3.4.4.2.1. Eucleação química**

É reconhecido que a seleção de oócitos receptores de alta qualidade para a TN aumenta a eficiência da clonagem e o número da prole obtida (MIYOSHI et al., 2003). Como foi dito anteriormente, o procedimento de enucleação convencional é invasivo e envolve a coloração do núcleo com Hoechst 33342 e utilização de irradiação UV para confirmação da enucleação. A irradiação UV causa significativa diminuição no desenvolvimento de embriões ao estágio de blastocisto, principalmente devido à indução de alterações de membrana e componentes intracelulares de oócitos bovinos (SMITH, 1993) e de defeitos causados na cromatina (DOMINKO et al., 2000).

Considerando-se que o oócito é enucleado durante o processo de TN, os defeitos de cromatina induzidos pela irradiação UV podem não ter papel na alteração do potencial de desenvolvimento de embriões oriundos dessa técnica. Porém, o DNA mitocondrial permanece nos citoplastos enucleados, podendo ser afetado durante a exposição à UV, alterando, assim, o metabolismo do embrião reconstituído (FISCHER RUSSEL et al., 2005).

A injúria causada ao oócito é agravada pela remoção de volume considerável de citoplasma (~ 30%) ao redor da placa metafásica do oócito receptor durante o procedimento de enucleação, citoplasma que contém RNAm, proteínas e precursores moleculares essenciais ao desenvolvimento embrionário inicial até a ativação do genoma embrionário (BARNES e EYESTONE, 1990).

Ainda, o procedimento de enucleação é um evento crucial para a clonagem devido à eliminação de qualquer contribuição genética do citoplasma receptor. Rotineiramente, a enucleação pode resultar em até 30% de DNA residual nos citoplastos (LI et al., 2004). A razão para isso é que o 1º CP está freqüentemente deslocado da posição esperada em relação à metáfase, assim como mostraram Mohamed Nour e Takahashi (1999). Esses autores observaram que a cromatina em MII pode ser encontrada em diferentes localizações em relação ao CP após 18 a 20 horas

de maturação, encontrando 40,7% do material nuclear imediatamente adjacente ao CP, 28,8% próximo ao CP, mas não em íntima associação, 15,3% no meio do citoplasma e 15,3% do material localizado na região oposta ao CP.

Assim, a enucleação química é um procedimento muito atrativo por causar mínima diminuição do volume citoplasmático e do conteúdo protéico e molecular, além de fatores associados ao fuso, que são essenciais para o adequado desenvolvimento embrionário (FISCHER RUSSEL et al., 2005). Várias substâncias têm sido utilizadas para indução de enucleação química, incluindo o etoposídeo (FULKA e MOOR, 1993; ELSHEIKH et al., 1997, 1998; KARNIKOVA et al., 1998), a colchicina e a demecolcina (BAGUISI e OVERSTRÖM, 2000; GASPARRINI et al., 2003; IBÁÑEZ et al., 2003).

Oócitos murinos em metáfase I, cultivados em meio suplementado com etoposídeo e cicloheximide durante a transição anáfase/telófase, propiciaram 96% de eficácia na enucleação de acordo com Fulka e Moor (1993). Porém, na mesma espécie, desenvolvimento limitado foi observado com o uso de citoplastos provenientes dessa técnica (GASPARRINI et al., 2003). Além de murinos (FULKA e MOOR, 1993; ELSHEIKH et al., 1997; KARNIKOVA et al., 1998) e suínos (SAVARD et al., 2004), essa técnica também foi descrita em bovinos (SARAIVA et al., 2009), utilizando-se a demecolcina como agente químico auxiliador da enucleação, porém com resultados insatisfatórios na última espécie.

A enucleação assistida quimicamente de oócitos em MII é outra técnica que vem despertando grande interesse da comunidade científica. Normalmente utiliza-se um agente desestruturador de microtúbulos, a demecolcina, que induz à formação de uma protrusão na região cortical oocitária, próxima ao 1º CP, contendo todo o material nuclear condensado. Assim, permite-se a retirada desse material através de micromanipulação, sem a necessidade de coloração e exposição à UV. Essa técnica foi relatada em coelhos (YIN et al., 2002a), suínos (YIN et al., 2002b), murinos (GASPARRINI et al., 2003) e bovinos (LI et al., 2004; VAJTA et al., 2004; SARAIVA et al., 2009), resultando em não comprometimento do desenvolvimento *in vivo* e possibilitando o nascimento de clones de coelhos (YIN et al., 2002a), suínos (YIN et al., 2002b) e murinos (GASPARRINI et al., 2003). Porém, devido aos MTs serem

fundamentais em muitos processos celulares durante o desenvolvimento embrionário, os efeitos da demecolcina no desenvolvimento de embriões reconstituídos devem ser intensamente estudados (IBÁÑEZ et al., 2003).

#### **3.4.4.3. Sincronização entre o ciclo celular da célula doadora de núcleo e do citoplasto receptor**

Numerosos estudos realizados em diferentes espécies de mamíferos têm demonstrado a importância da sincronização do ciclo celular entre o núcleo da célula doadora e o oócito receptor no potencial de desenvolvimento de embriões reconstituídos (SMITH et al., 1988; OTAEGUI et al., 1994), de forma que seja mantida a correta ploidia do embrião (BORDIGNON et al., 2001).

Esses conceitos estão baseados nos efeitos que o MPF tem sobre o núcleo. Na sua forma ativa, o MPF regula o processo de duplicação e divisão celular, numa cascata de eventos, em que se observa rompimento do envelope nuclear, condensação dos cromossomos, reorganização do citoesqueleto e alterações na morfologia da célula, o que permite à célula entrar em mitose ou meiose (NURSE, 1990; MASUI, 1992).

Os eventos morfológicos que ocorrem no núcleo doador após a transferência para um oócito enucleado têm sido estudados em várias espécies, incluindo murinos (CZOŁOWSKA et al., 1984), lóparos (COLLAS e ROBL, 1991), suínos (PRATHER et al., 1990) e bovinos (KANKA et al., 1991). Sequencialmente, ocorre rompimento do envelope nuclear, condensação cromossômica prematura, dispersão dos nucléolos, reorganização do envelope nuclear, e aumento do volume nuclear. Alguns relatos (COLLAS et al., 1992a,b) sugerem que a indução da quebra do envelope nuclear e a condensação cromossômica são essenciais para a reprogramação nuclear, sendo que esses eventos aumentariam o potencial de desenvolvimento de embriões reconstituídos.

Estudos em coelhos, usando blastômeros como células doadoras de núcleo, mostraram que houve maior desenvolvimento embrionário quando blastômeros em G1 ou na fase S inicial foram utilizados no processo de TN do que quando núcleos no final da fase S ou estágio G2 foram transferidos (COLLAS et al., 1992a), quando se

observou grande proporção de blastômeros dos embriões reconstituídos com anormalidades cromossômicas (COLLAS et al., 1992b).

Embora existam evidências de que a utilização de citoplastos não ativados (oócitos enucleados em metáfase II) e células doadoras sincronizadas antes da fase S proporcionem melhores taxas de desenvolvimento, corroborando com a proposição de que quanto maior o tempo de exposição do núcleo doador ao ambiente citoplasmático, melhor seria a reprogramação nuclear (TANI e TSUNODA, 2001), não se pode descartar a possibilidade do uso de citoplastos com baixos níveis do MPF na clonagem, uma vez que já foi demonstrada sua viabilidade, com a produção de clones a termo (BAGUISI et al., 1999).

Durante o ciclo de divisão celular, os níveis da  $p34^{cdc2}$  permanecem constantes, porém, os níveis das ciclinas variam. *In vivo*, a ativação da  $p34^{cdc2}$  desencadeia a entrada da célula na fase M, levando ao rompimento do envelope nuclear, condensação cromossômica, reorganização do citoesqueleto e a outras mudanças na morfologia das células. A fosforilação *in vitro* da histona H1 tem sido usada como base para o ensaio bioquímico para a estimativa da atividade da  $p34^{cdc2}$  (CAMPBELL et al., 1993).

Na clonagem embrionária, em que há uma contínua duplicação do DNA nos blastômeros devido às sucessivas clivagens, o fato de que a maioria das células encontra-se em fase S do ciclo celular (80%) faz com que seja necessário o uso de citoplastos pré-ativados e, portanto, com baixos níveis do MPF para que a ploidia do embrião reconstituído seja mantida (CAMPBELL et al., 1996), já que em oócitos em metáfase II (alta atividade do MPF), a manutenção de um núcleo diplóide só é possível com o uso de blastômeros em fase  $G_1$  do ciclo celular.

A sincronização do ciclo celular do núcleo doador pode ser realizada nas fases  $G_1$ , S ou  $G_2$  utilizando-se, respectivamente, inibidores específicos da  $\alpha$  DNA polimerase (que impedem a replicação do DNA), inibidores da polimerização dos filamentos de tubulina (que interrompem o ciclo celular em metáfase) e inibidores da formação do complexo ativo do MPF.

Durante o ciclo celular, todo o DNA genômico deve ser replicado uma única vez antes que ocorra a mitose. Se houver falha na replicação do DNA ou se o mesmo for

replicado mais de uma vez, a ploidia desse núcleo, no momento da mitose, estará incorreta. Os mecanismos pelos quais a replicação é restrita a uma única vez durante cada ciclo celular não são claros, porém, existem evidências de que a manutenção de uma membrana nuclear intacta é crucial para esse controle (CAMPBELL et al., 1993).

Estudos mostram que ocorre rompimento da membrana nuclear e condensação cromossômica imediatamente após a fusão de um núcleo doador a um oócito em MII (KANKA et al., 1991). Assim, pode ser hipotetizado que a remoção da membrana nuclear irá remover o bloqueio à re-replicação do DNA previamente replicado e levará à ocorrência da síntese de DNA no núcleo doador de todas as fases do ciclo celular, incluindo aqueles das fases S ou G2. Porém, se a TN for realizada após o declínio da atividade do MPF, então a integridade da membrana nuclear será preservada e ocorrerá a replicação regulada de todo núcleo.

Baseados nessa hipótese, Campbell et al. (1993) avaliaram o potencial de replicação de núcleos em diferentes fases do ciclo celular expostos a diferentes ambientes citoplasmáticos em oócitos reconstituídos. Para isso, embriões produzidos *in vitro* que se apresentavam no estágio de 8 células foram sincronizados nas fases G1/S ou G2 do ciclo celular. Os blastômeros sincronizados foram fundidos a oócitos maduros não-ativados após 30 h de MIV ou a oócitos ativados, após 10 h do início da ativação, ou seja, 40 h após o início da maturação. Quando núcleos estacionados em G1/S ou em G2 foram transferidos para oócitos não-ativados, a ocorrência da síntese de DNA foi influenciada pela fase do ciclo celular tanto do citoplasma receptor quanto do núcleo. Síntese de DNA foi observada quando núcleo G1/S foi transferido para citoplastos ativados ou não. Porém, quando núcleo em G2 foi transferido, síntese de DNA foi observada somente com a utilização de oócitos não-ativados como citoplastos receptores, não havendo síntese de DNA quando oócitos ativados foram utilizados. Assim, esses autores confirmaram a hipótese levantada anteriormente.

Entretanto, quando células diferenciadas são usadas como doadoras de núcleo, maior nível de reprogramação do núcleo é necessário quando comparado a blastômeros. A transferência de um núcleo diplóide para um citoplasto não ativado, com alta atividade do MPF, promove o rompimento do envelope nuclear e prematura

condensação dos cromossomos, permitindo o direto e imediato contato da cromatina com vários fatores citoplasmáticos para o início da reprogramação nuclear. Tani e Tsunoda (2001) verificaram que a direta exposição do núcleo a um citoplasto não ativado foi efetiva para a reprogramação do núcleo de células do *cumulus*, em bovinos, com alto desenvolvimento a blastocistos, mas quando citoplastos pré-ativados (com baixos níveis de MPF) foram fundidos com células do *cumulus* em qualquer fase do ciclo celular ( $G_0$ - $G_1$ ,  $G_1$ , S,  $G_2$  ou M) aparentemente não houve reprogramação completa do núcleo, pois todos os embriões reconstituídos pararam seu desenvolvimento no estágio de 8 células.

A atividade transcricional de núcleos somáticos transplantados também foi mais rápida e mais efetiva quando foram utilizados citoplastos em metáfase, comparando-se a citoplastos em intérfase (BARNES et al., 1993). Juntos, esses resultados indicam que o estágio do ciclo celular influencia a capacidade de reprogramação de embriões reconstituídos, e, portanto, pode agir diretamente no remodelamento da cromatina do núcleo transplantado (BORDIGNON et al., 2001).

Um método alternativo para prolongar a exposição do núcleo doador aos fatores citoplasmáticos, auxiliando a completa reprogramação, envolveria o uso da reclonagem, técnica que utiliza os blastômeros dos embriões reconstituídos para uma segunda transferência nuclear. O uso da reclonagem mostrou ser possível a obtenção de animais a termo a partir de células somáticas adultas (GALLI et al., 1999), sendo necessário, no entanto, maiores estudos para verificação do seu real benefício na reprogramação nuclear de células diferenciadas.

#### **3.4.4.4. Ativação artificial e cultivo *in vitro* dos embriões reconstituídos**

Na maior parte dos mamíferos, oócitos são ovulados e mantidos em MII até que ocorra ativação induzida pelo espermatozóide ou por estímulo artificial (KUPKER et al., 1998). Com a fecundação, os oócitos retomam a meiose e são submetidos a uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas, em um processo denominado de ativação oocitária (TALMOR-COHEN et al., 2002). A penetração do espermatozóide no oócito em MII leva a modificações bioquímicas e celulares, com elevações transitórias e



periódicas do  $\text{Ca}^{+2}$  livre intracelular (FISSORE et al., 1992), que permitem que o oócito saia do bloqueio da meiose em decorrência da inativação do MPF e do fator citostático (CSF) (LORCA et al., 1991), ocorrendo uma cascata de eventos, como a excitose de grânulos corticais, a descondensação do núcleo espermático, o recrutamento de RNAm materno, a formação dos pronúcleos e o início da síntese de DNA.

Na clonagem, é necessário que se mimetize a ação do espermatozóide, a fim de que esses eventos também ocorram e permitam adequado desenvolvimento do embrião reconstituído. Diferentes tratamentos têm sido empregados no processo de ativação na clonagem, incluindo métodos físicos, como pulsos elétricos (OZIL, 1990) ou métodos químicos, tais como o etanol (LIU et al., 1998), cálcio ionóforo (SOLOY et al., 1997), ionomicina (SUSKO-PARRISH et al., 1994), estrôncio (WAKAYAMA et al., 1998; YAMAZAKI et al., 2005), cicloheximide (PRESICCE e YANG, 1994; LIU et al., 1998), ou 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) (SUSKO-PARRISH et al., 1994). Esses tratamentos de ativação podem ser usados sozinhos ou em combinação, que resulta em melhores resultados.

Os pulsos elétricos promovem aumento do  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular por meio da abertura temporária de poros na membrana plasmática do oócito, permitindo trocas de íons e macromoléculas, com entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular (ZIMMERMANN e VIENKEN, 1982). Dentre os métodos químicos, os ionóforos de cálcio levam ao aumento do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  em pulso único (KLINE e KLINE, 1992; NAKADA e MIZUNO, 1998) e são utilizados na maioria dos protocolos, geralmente em associação com outros agentes ativadores.

O etanol, normalmente utilizado a 7%, promove rápida potencialização da liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  mediada pela estimulação da formação de inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{InsP}_3$ ) na membrana plasmática (ILYIN e PARKER, 1992). Porém, a exposição a soluções diluídas de etanol podem promover danos ao citoesqueleto (O'NEILL e KAUFMAN, 1989).

Já o cicloheximide é um inibidor de síntese protéica, que normalmente é usado em combinação com outros agentes, como por exemplo, ionóforos ou ionomicina, de forma a prevenir a produção de ciclina  $B_1$ , componente do MPF, fazendo com que esse

permaneça inativo (PRESICCE e YANG, 1994; NUSSBAUM e PRATHER, 1995; TANAKA e KANAGAWA, 1997).

O 6-DMAP é um inibidor de fosforilação protéica também muito utilizado em associação a outros agentes ativadores, que atua inativando a c-mos e a MAP kinase e reduzindo as atividades do MPF e do CSF (VERLHAC et al., 1993, 1994).

Finalmente, o estrôncio, rotineiramente utilizado na clonagem de camundongos (KISHIKAWA et al., 1999; WAKAYAMA et al., 1998, 1999, 2000, 2001), induz repetitivos aumentos da concentração de  $Ca^{+2}$  livre intracelular de modo semelhante ao que ocorre na ativação dos oócitos após a fecundação (BOS-MIKICH et al., 1997). Em bovinos, esse agente também já foi utilizado com sucesso (MÉO et al., 2004, 2005) e mostrou-se viável na clonagem (YAMAZAKI et al., 2005).

Quando o estímulo de ativação é insuficiente, não ocorre inativação da MAPK e os níveis de MPF são restabelecidos (KIKUCHI et al., 2000). Conseqüentemente, os eventos posteriores, como recrutamento de RNAm, formação de pronúcleo, síntese de DNA e clivagem não ocorrem (MÉO et al., 2004).

Após a reconstituição embrionária e ativação partenogenética, tem-se adotado, basicamente, as mesmas condições de cultivo de embriões produzidos *in vitro* (PIV). Porém, considerando-se que a reprogramação nuclear é um fenômeno complexo que tem seu início nesse período do desenvolvimento embrionário, aliado aos problemas ainda persistentes da PIV, embriões clones reconstituídos devem ser muito mais susceptíveis a alterações gênicas, que podem ser agravadas frente às condições de cultivo atualmente utilizadas. Sabe-se que o metabolismo embrionário de embriões PIV pode ser alterado de acordo com as condições empregadas, como: temperatura, pH, osmolaridade, atmosfera, co-cultivo, fonte protéica e energética (THOMPSON et al., 1990; THOMPSON, 1996, 2000; BAVISTER, 2000; KRUIP et al., 2000; FARIN et al., 2001), que se refletem em problemas durante a gestação.

#### **3.4.5. Eficácia da clonagem**

As taxas de sucesso da TN, avaliadas pelo número de animais nascidos, permanecem na ordem de 1% a 5%, na maioria das espécies domésticas (CAMPBELL

et al., 2005), embora existam relatos de diferentes eficiências entre clones bovinos dos dois sexos, com aproximadamente 7% para fêmeas e 12% para machos (MEIRELLES et al., 2007).

Como se trata de uma técnica relativamente complexa, com grande número de variáveis em cada uma das etapas envolvidas, decorrentes de diferentes metodologias empregadas pelos diversos grupos de pesquisa, aliadas ao fato de que existem diferenças espécie-específicas, há ampla variação dos resultados no que diz respeito ao desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto (ROBL, 1999; WELLS et al., 1999; WESTHUSIN et al., 2001). Em bovinos, as taxas variam desde inferiores a 5% até superiores a 65% (WESTHUSIN et al., 2001), e os resultados de obtenção de gestações a termo, a partir de embriões reconstituídos com células somáticas são, em geral, menores que 5% (CIBELLI et al., 1998; WELLS et al., 1999; CAMPBELL et al., 2005).

Em camundongos, estudos mostram alta taxa de implantação embrionária (57-71%), porém, baixa taxa de nascimentos (2-3%) na transferência nuclear com células somáticas (WAKAYAMA et al., 1998; YANAGIMACHI, 2002). Em embriões bovinos, espécie em que é mais fácil o monitoramento da gestação, os índices de implantação, estabelecimento de prenhez e desenvolvimento até os 30-35 dias de gestação são semelhantes aos índices obtidos a partir de embriões PIV (GALLI et al., 1999). Entretanto, no diagnóstico aos 90 dias de gestação, em mais da metade das prenhez estabelecidas ocorre o abortamento (CIBELLI et al., 1998), e até o nascimento a termo, mais de 40% das gestações restantes são perdidas (HEYMAN et al., 2002), limitando o sucesso da técnica a 5-6% (CHAVATTE-PALMER et al., 2004; WELLS et al., 2004).

A alta taxa de mortalidade embrionária durante o início da gestação é atribuída à inadequada transição da nutrição do saco vitelínico para o alantóide, em razão da baixa vascularização do mesmo (De SOUSA et al., 2001); à rejeição imune (HILL et al., 2002), e às alterações placentárias (placentomegalia e reduzido número de placentônios; HILL et al., 1999, 2000, SMITH et al., 2000; De SOUSA et al., 2001).

Na segunda metade da gestação também são freqüentes perdas decorrentes de alterações placentárias como hidroalantóide (HEYMAN et al., 2002; PACE et al., 2002;

CONSTANT et al., 2006), aumento do diâmetro do cordão umbilical, edema das membranas placentárias e presença de menor número de placentônios, porém de maior tamanho (KRUIP e DAAS, 1997; HILL et al., 1999, 2000; WELLS et al., 1999). Até mesmo naqueles animais que se desenvolvem a termo, anormalidades placentárias são observadas (LOI et al., 2006).

A viabilidade pós-natal dos animais oriundos de transferência nuclear é igualmente reduzida. As disfunções observadas nos clones após o nascimento incluem problemas músculo-esqueléticos (WELLS et al., 2004), problemas cardíacos (CHAVATTE-PALMER et al., 2002), disfunções imunes (RENARD et al., 1999), distúrbios renais (CHAVATTE-PALMER et al., 2004), alterações hepáticas (HILL et al., 1999; HEYMAN et al., 2002) e alterações respiratórias (HILL et al., 1999). Ainda, aumento do peso corporal do recém-nascido e alta mortalidade neonatal são comuns em bezerros clonados (WILSON et al., 1995; GARTNER et al., 1998; HILL et al., 1999; YOUNG e FAIRBURN, 2000; HEYMAN et al., 2002), em um fenômeno denominado “Síndrome da Cria Gigante” (LOS – “Large Offspring Syndrome”). Uma vez que a LOS também ocorre a partir de embriões PIV, ainda não é claro se a clonagem por si só seria uma causa primária dessa síndrome, podendo-se atribuir esses problemas aos sistemas de cultivo (YONG e YUQIANG, 1998).

Dificuldades no parto também são relatadas na clonagem, e estariam relacionadas a distúrbios endocrinológicos com diminuição das concentrações plasmáticas de cortisol, que seria insuficiente para desencadear o sistema IGF ligado à sinalização para a indução da parturição (MATSUZAKI e SHIGA, 2002). A administração de corticosteróides pode aumentar as chances de sobrevivência, induzindo o parto ou preparando-o para cesariana, bem como pode ser importante na maturação pulmonar dos clones (WELLS et al., 1999; PTAK et al., 2002).

Porém, as anormalidades observadas nos animais clonados não são herdáveis (TAMASHIRO et al., 2002; WELLS et al., 2004; WELLS, 2005). Assim, a causa dessas deficiências não reside em alterações cromossômicas ou mutações do DNA, mas sim em falhas de reprogramação das características epigenéticas das células, que levam, por sua vez, a alterações na expressão gênica global.

Apesar dos recentes avanços verificados nos últimos anos nas pesquisas com TN, ainda se faz necessário melhorar a eficiência das atuais técnicas empregadas na clonagem a fim de torná-las viáveis. O desenvolvimento de novas estratégias de produção de clones a partir de células-tronco pode modificar a situação atual (MEIRELLES et al., 2007), como por exemplo com o uso de células “iPS” (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006), sigla em inglês que significa célula-tronco pluripotente induzida.

#### **3.4.6. Reprogramação nuclear em clones**

Após a introdução do núcleo doador no citoplasto, o desenvolvimento embrionário normal dependerá da capacidade do citoplasma do oócito remodelar a estrutura da cromatina e reprogramar de modo apropriado os padrões de expressão gênica do núcleo doador. Portanto, o núcleo deve se reprogramar ao estágio de zigoto e adotar seus parâmetros do ciclo celular, com ativação de genes em níveis temporal e espacial corretos para que o desenvolvimento do embrião reconstituído ocorra de modo normal.

Acredita-se que, guiado pelo ooplasma, o núcleo somático encerra seu próprio programa de expressão gênica somático e restabelece um programa particular de expressão gênica embrionário (RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2009).

Os mecanismos envolvidos na reprogramação do núcleo ainda são pouco conhecidos, sendo que vários estudos foram conduzidos nesse sentido para melhor compreender esses eventos, tendo sido verificadas modificações estruturais do núcleo, com rompimento do envelope nuclear e condensação dos cromossomos (BARNES et al., 1993; COLLAS e ROBL, 1991), descondensação da cromatina após a ativação do oócito e reforma do envelope nuclear (STICE e ROBL, 1988).

A ativação de genes durante o desenvolvimento ocorre mediante modificações epigenéticas, tais como: alteração dos padrões de metilação do genoma (REIK et al., 2001), modificação (acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação) e troca de histonas (somáticas por isoformas embrionárias; GAO et al., 2004), alterações na morfologia nucleolar (CZOŁOWSKA et al., 1984; KANKA et al., 1999), modificações de lâmina nuclear (PRATHER et al., 1989a, 1991), remodelação da cromatina e de outras

proteínas associadas à mesma (LATHAM, 1999; CAMPBELL et al., 2005), modificação de genes “imprinted” (LATHAM, 1999), inativação do cromossomo X (EGGAN et al., 2000) e restabelecimento do comprimento dos telômeros, quando células somáticas são utilizadas como doadoras de núcleo, evidenciando a complexidade do processo de reprogramação nuclear.

Como a partir da transição materno-zigótica ocorre a ativação do genoma embrionário, não havendo mais dependência apenas dos estoques maternos de transcritos de RNA e proteínas para prosseguir seu desenvolvimento (MEIRELLES et al., 2004), é necessário que a reprogramação nuclear ocorra rapidamente, com a ativação dos genes ocorrendo no tempo e padrão de expressão semelhantes ao de um embrião produzido por fecundação.

Estudos iniciais em anfíbios identificaram várias modificações morfológicas e funcionais no núcleo somático após transferência para citoplasma oriundo de zigoto previamente enucleado. Essas mudanças incluem descondensação nuclear, indução de síntese de DNA, influxo de proteínas citoplasmáticas para o núcleo, trocas de proteínas entre o núcleo e o citoplasma, parada da síntese de RNA pelo núcleo transplantado e repressão/reativação de genes específicos do desenvolvimento embrionário (BORDIGNON et al., 2001).

A mudança morfológica mais visível observada no núcleo transplantado é a rápida descondensação da cromatina, relatada em anfíbios (GURDON, 1964) e em mamíferos, incluindo camundongos (CZOLOWSKA et al., 1984), coelhos (STICE e ROBL, 1988; COLLAS e ROBL, 1991) e suínos (PRATHER et al., 1991). A troca de proteínas ácidas e básicas entre o núcleo doador e o citoplasma, possivelmente tem relação com essa mudança. Especula-se que proteínas oriundas do citoplasma importadas para o núcleo mediam o rearranjo estrutural da cromatina, que funcionalmente volta a um estado totipotente. Eventos similares ocorrem naturalmente após a fecundação, quando a nucleoplasmina e as histonas ooplásmicas mediam o remodelamento da cromatina espermática para formar o pronúcleo masculino (BORDIGNON e Smith, 1999).

O mecanismo molecular preciso que envolve a base da reprogramação nuclear, responsável pela ativação específica e repressão de genes nos embriões reconstituídos ainda é um mistério a ser esclarecido (RIDEOUT III et al., 2001; HAN et al., 2003; JOUNEAU e RENARD, 2003; SHI et al., 2003). Embora vários estudos concluam que o oócito é capaz de reprogramar um núcleo transplantado (CZOLOWSKA et al., 1984; HOWLETT et al., 1987; DYBAN et al., 1988; LATHAM et al., 1991; PRATHER et al., 1991), outros estudos têm identificado padrões anormais de atividade nuclear em embriões reconstituídos.

Existem algumas estratégias descritas, como a técnica de “somatic cell chromatin transfer – SCCT”, que é uma tentativa de facilitar a reprogramação, devido à exposição das células somáticas, antes da transferência, a um extrato de células somáticas que induz a condensação cromossômica e promove a remoção e solubilização de fatores nucleares, melhorando o remodelamento nuclear. Comparada à técnica convencional, a SCCT tem mostrado maior sobrevivência de animais clonados, e assim, poderia ser uma ferramenta útil na compreensão dos mecanismos envolvidos na reprogramação nuclear (revisado por RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2009).

Quando o núcleo é transferido para oócitos não-ativados, ou seja, com alta atividade do MPF, a membrana nuclear se desfaz rapidamente e os cromossomos são expostos ao citoplasma do oócito e reprogramados. Já quando um núcleo embrionário é transferido para oócitos na fase S, a membrana nuclear não se desfaz, mas ainda assim os cromossomos das células doadoras são reprogramados durante o aumento do volume nuclear.

Mas existem algumas controvérsias quanto à importância do MPF na reprogramação nuclear. Quando células somáticas são fundidas com oócitos na fase S, partenogeneticamente ativados 6 h antes da fusão, os embriões reconstituídos estacionam seu desenvolvimento no estágio de 8 células, momento em que ocorre a ativação do genoma embrionário (CAMOUS et al., 1986), independente da fase do ciclo celular do núcleo doador. Isso indica que oócitos bovinos em MII apresentam “fatores de reprogramação” em seu citoplasma, que desaparecem após a ativação partenogenética. A natureza desses fatores de reprogramação, porém, ainda não é

muito clara. O fato de que células somáticas foram reprogramadas quando transferidas para oócitos enucleados em MII, mas não quando transferidas para oócitos ativados previamente, indicavam que o MPF seria um candidato a fator reprogramador.

Porém, Tani et al. (2003) mostraram que o potencial de desenvolvimento de embriões reconstituídos é claramente diferente quando são utilizadas células somáticas doadoras nas fases G0/G1 ou na fase M. Esses autores observaram que o potencial de oócitos que receberam células G0/G1 em se desenvolver até o estágio de blastocisto diminuiu significativamente quando o núcleo foi fundido com oócitos ativados 1 h antes do processo de fusão, porém, quando transferiram células M para oócitos enucleados ativados 1-5 h antes da fusão, o potencial de desenvolvimento não foi diferente, diminuindo apenas quando foram utilizados oócitos ativados 6 h antes. Assim, concluíram que o MPF não é um fator fundamental para a reprogramação nuclear das células somáticas, já que as células M foram reprogramadas mesmo após o declínio do MPF. O MPF teria maior importância para células doadoras que não estão na fase M, para que haja adequado rompimento da membrana nuclear.

A baixa eficiência da clonagem e a alta mortalidade de clones podem ser causadas, em parte, pela expressão desbalanceada de alguns genes importantes para o desenvolvimento embrionário e fetal. Os padrões de expressão gênica em embriões no período pré-implantacional são alterados pelas condições de cultivo *in vitro*, incluindo o sistema básico de cultivo, como a suplementação protéica (WRENZYCKI et al., 1999, 2001a) e o protocolo de transferência nuclear (WRENZYCKI et al., 2001b). Problemas ligados à expressão errônea em momentos e padrões não correspondentes àqueles verificados durante o desenvolvimento normal de embriões produzidos por fecundação têm sido relatados para diversos genes e em diferentes espécies (De SOUSA et al., 1999; DANIELS et al., 2000, 2001; WRENZYCKI et al., 2001, 2002; NIEMANN et al., 2002; RAVELICH et al., 2004a,b, 2006).

Vários genes com expressão alterada já foram identificados em bovinos produzidos *in vitro* (PIV), tais como genes ligados ao cromossomo X: *G6PD* e *PGK* (WRENZYCKI et al., 2002), à apoptose e ao estresse térmico e oxidativo: *HSP 70.1*, *BAX*, *SOD* e *SOX*, ao transporte de glicose: *GLUT-3* e *GLUT-4*, à comunicação celular:



*CX43* e *CX31* e à diferenciação: *LIF* e *LR-β* (LAZZARI et al., 2002; RIZOS et al., 2002). Modificações do protocolo de TN como o tipo de célula utilizada, número de repiques, ciclo das células doadoras de núcleo e protocolos de ativação apresentam vários efeitos nos padrões de expressão desses genes, principalmente daqueles relacionados à adaptação ao estresse, função trofoblástica, metilação de DNA e inativação do cromossomo X (WRENZYCKI et al., 2001b, 2002; WRENZYCKI e NIEMANN, 2003).

O gene *HSP* (“heat shock protein”) foi identificado como um indicador sensível de estresse embrionário no período pré-implantação em bovinos. A regulação da expressão desse gene pode ser afetada por condições inadequadas de cultivo e por uma variedade de agentes estressantes, como aminoácidos, aumento de temperatura, hormônios esteróides e outros.

As proteínas de choque térmico (HSPs – “Heat Shock Proteins”) foram assim denominadas por terem sido identificadas como aquelas cuja expressão era aumentada pela exposição ao calor, sendo que células desprovidas ou com baixos níveis dessas proteínas toleravam menores níveis de estresse (RIBEIRO et al., 2009). Elas são classificadas em cinco famílias, de acordo com o peso molecular (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e a família das “pequenas HSPs”), e possuem papel protetor dentro da célula, além de função anti-apoptótica (VIREQUE et al., 2009).

Pelo fato de que a expressão de genes relacionados à resposta celular, tais como o *HSP* e *BAX*, pode ser alterada durante o cultivo embrionário (WARZYCH et al., 2007), os níveis de expressão desses genes poderiam ser utilizados como marcadores das condições de cultivo *in vitro* (WRENZYCKI et al., 2005). Wrenzycki et al. (2001) observaram que alterações nos protocolos de ativação levaram a menor expressão do gene *HSP 70.1* (sinonímia para *HSPA1A*) em embriões clonados em relação àqueles produzidos *in vitro*.

Ainda, problemas com relação à inativação do cromossomo X, regulado pelo gene “imprinted” *XIST* (EGGAN et al., 2000; XUE et al., 2002; EGGAN e JAENISCH, 2004; SENDA et al., 2004) foram descritos em clones.

A inativação do cromossomo X é um mecanismo que assegura a transcrição de somente um cromossomo X nas células de ambos os sexos (MIGEON et al., 2005). O

gene *XIST* participa na inativação do cromossomo X, evitando a super-expressão de genes ligados a esse cromossomo (WRENZYCKI et al., 2002). Transcritos do gene *XIST* se ligam ao cromossomo X do qual eles foram transcritos e induzem a modificações da cromatina, tornando a maioria dos genes pertencentes ao cromossomo silenciosos.

Em todas as células, um dos dois cromossomos X, o X materno ou o X paterno, podem ser inativados aleatoriamente. Após o silenciamento, o X inativo permanece extremamente estável, apresentando características específicas, como heterocromatinização, replicação tardia do DNA, níveis altos de expressão do gene *XIST*, acúmulo de RNA do *XIST*, metilação das ilhas CpG e modificações de histonas (TAKAGI, 2003). Vários estudos relatam que uma região do cromossomo X, denominada Centro de Inativação do X (CIX), é essencial para o início, propagação e manutenção da inativação.

Acredita-se que a inativação do cromossomo X seja essencial para a embriogênese normal, pois foi comprovado que a manutenção de dois cromossomos X ativos durante a implantação em camundongos retardou o desenvolvimento e causou morte desses embriões (TAKAGI et al., 1990). Estão relacionados ao evento de inativação do cromossomo X o alto nível de metilação do seu DNA em regiões promotoras e a hipoacetilação das histonas H4.

O sistema de cultivo *in vitro*, por si só, afeta profundamente os padrões de expressão desses importantes genes do desenvolvimento. Existem diferenças quanto ao desenvolvimento relacionadas ao sexo em alguns sistemas de cultivo *in vitro*, resultando em desenvolvimento mais rápido de embriões do sexo masculino (AVERY et al., 1991, 1992). Essa diferença nas taxas de desenvolvimento entre embriões femininos e masculinos tem sido atribuída a alterações na atividade metabólica de enzimas ligadas ao cromossomo X envolvidas no metabolismo energético. Os componentes dos meios de cultivo podem afetar a sobrevivência de embriões femininos, alterando a proporção de sexo (KOCHHAR et al., 2001), o que pode explicar o número superior de bezerros machos nascidos oriundos de embriões produzidos *in vitro*. Estudos comparando diferentes meios de cultivo mostram que a alta concentração

de glicose poderia ser um dos fatores responsáveis pela aceleração do desenvolvimento *in vitro* de embriões do sexo masculino (PEIPPO et al., 2001).

Ainda, o gene *G6PD* (“glucose-6-phosphate dehydrogenase”) é outro gene importante para o metabolismo, estando relacionado à detoxificação de radicais livres, sendo localizado no cromossomo X, e, portanto, sujeito à inativação.

A enzima G6PD atua como fator limitante na via pentose fosfato, na qual produz NADPH e ribose-5-fosfato, precursor de todos os nucleotídeos (RIEGER, 1992). O NADPH, por sua vez, é crítico para manutenção da glutathiona (GSH) em sua forma reduzida, que é fundamental para desintoxicação de radicais livres e peróxidos lipídicos. Dada a importância da G6PD no estresse oxidativo, embriões e fetos que apresentam deficiência dessa enzima são mais susceptíveis ao estresse oxidativo que os demais indivíduos (RIEGER, 1992).

Contudo, Wrenzycki et al. (2002) verificaram o dobro da expressão do gene *G6PD* em mórulas e blastocistos de fêmeas oriundas da PIV em relação a machos, mostrando que os dois cromossomos X estavam ativos nas fêmeas, enquanto em embriões obtidos *in vivo* observou-se padrão similar de expressão em machos e fêmeas, sugerindo que a compensação de dosagem para expressão do gene *G6PD* não ocorreu em embriões produzidos *in vitro*. Uma incompleta inativação do cromossomo X poderia levar ao aumento dos níveis de glicose intracelular, com acúmulo de metabólitos, prejudicando o desenvolvimento de embriões do sexo feminino (PEIPPO et al., 2001).

A verificação de RNAm de genes essenciais ao desenvolvimento inicial, como os descritos anteriormente, fornece uma potencial ferramenta para avaliação da normalidade de embriões produzidos *in vitro* e micromanipulados (NIEMANN e WRENZYCKI, 2000). Genes envolvidos no desenvolvimento pré e pós-implantação podem ser utilizados como marcadores genéticos para avaliação de viabilidade embrionária.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção e maturação de oócitos

Oócitos bovinos foram obtidos a partir de aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouro, que foram colhidos e transportados em recipiente isotérmico contendo solução salina estéril e mantidos à temperatura de 30-35°C. No laboratório, os ovários foram lavados com solução salina estéril aquecida e os folículos ovarianos, medindo entre 3 e 8 mm de diâmetro, aspirados utilizando-se agulha 18-G acoplada à seringa descartável de 20mL. O fluido aspirado foi transferido para um tubo de poliestireno de 50mL e, ao término da aspiração, o sedimento formado foi distribuído em placas de poliestireno de 60mm de diâmetro, procedendo-se à seleção dos oócitos em microscópio estereoscópico.

Oócitos com aspecto homogêneo de citoplasma e compactação das células do *cumulus*, com pelo menos três a quatro camadas de células de revestimento foram selecionados. Em seguida, os oócitos foram lavados duas vezes em meio TCM-199 contendo 20mM de tampão HEPES, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,20mM de piruvato e 83,4µg/mL de amicacina (meio de lavagem) e uma vez em meio de maturação (TCM-199 com 25mM de tampão bicarbonato suplementado com 10% de SFB, 1,0µg/mL de FSH, 50µg/mL de hCG, 1,0µg/mL de estradiol, 0,20mM de piruvato e 83,4µg/mL de amicacina). Os oócitos foram então transferidos para microgotas de 100µL de meio de maturação (20-25 oócitos/gota), cobertas por óleo mineral. O cultivo dos oócitos para maturação *in vitro* se deu em estufa a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

### 4.2. Experimento I – Padronização das condições de cultivo em demecolcina de oócitos bovinos submetidos à EN química parcial e à EN química total

A maior parte dos trabalhos que relata o uso de EN química parcial na transferência nuclear preconiza a exposição à demecolcina por 2 h em concentração 0,4 – 0,5µg/mL. Porém, em nosso trabalho de mestrado (SARAIVA et al., 2006),

verificamos que uma concentração 10 vezes inferior (0,05µg/mL) possibilitou taxas de protrusões superiores em relação à concentração referida. Assim, no presente estudo, objetivamos inicialmente avaliar o menor tempo necessário de tratamento na concentração pré-definida, de forma que o melhor protocolo para EN química parcial fosse estabelecido.

Em seguida, verificamos as melhores condições de tratamento com demecolcina visando à técnica de EN química total.

#### **4.2.1. Avaliação do tempo de incubação de oócitos em MII em demecolcina para a EN química parcial**

Com o propósito de selecionar o tratamento que resultasse em maior taxa de formação de protrusão em menor tempo de incubação na demecolcina, oócitos em MII, maturados *in vitro* por 19 horas, foram desnudados com hialuronidase (2mg/mL) durante cinco minutos, com auxílio de pipetagens sucessivas e expostos a 0,05µg/mL de demecolcina por diferentes períodos. Amostras foram obtidas após 0 h; 0,25 h; 0,5 h; 1,0 h; 1,5 h e 2,0 h de tratamento e os oócitos foram então, corados com 10µg/mL de Hoechst 33342 durante 15 minutos, e observados sob microscópio de epifluorescência (330-385nm) quanto às taxas de formação de protrusão, sendo verificado se havia presença de todo o material nuclear condensado na protrusão formada. No grupo controle, amostras de oócitos cultivados em meio de MIV livre de demecolcina foram obtidas nos mesmos momentos citados. Foram realizadas cinco repetições. O melhor protocolo definido neste experimento foi utilizado, posteriormente, em procedimentos de EN química parcial.

#### **4.2.2. Avaliação de diferentes condições de cultivo para a EN química total**

Diante dos bons resultados obtidos em camundongos (GASPARRINI et al., 2003; IBÁÑEZ et al., 2003) e dos poucos trabalhos disponíveis que avaliam a enucleação química de oócitos ativados em bovinos (FISCHER RUSSEL et al., 2005), foram

realizados diversos experimentos com a finalidade de padronizar essa técnica na espécie bovina.

Buscou-se por meio desses experimentos, o desenvolvimento de protocolos que fornecessem os maiores índices de enucleação química após a ativação e o tratamento com demecolcina, que foi por sua vez, aplicado no início da ativação (Experimento A) ou após 2 h do início da mesma (Experimento B).

A) Exposição à demecolcina no início do processo de ativação partenogenética visando a EN química total

Oócitos foram maturados *in vitro* por 26 horas, desnudados como descrito anteriormente, e ativados artificialmente em meio HSOF com 10% SFB contendo ionomicina (5 $\mu$ M por 5 minutos) e em meio SOF com cicloheximide (10 $\mu$ g/mL) por até 5 horas. Foram estabelecidos três grupos: controle – CON (sem ativação e sem exposição à demecolcina), ativado – ATIV (exposto apenas aos agentes ativadores) e tratado – DEME (exposto a meio contendo agentes ativadores e 0,05 $\mu$ g/mL de demecolcina). O tratamento com demecolcina foi realizado desde o início do processo de ativação. Foram obtidas amostras dos três grupos com 0, 4 e 5 horas de tratamento. Os oócitos foram corados com 10 $\mu$ g/mL de Hoechst 33342 durante 15 minutos e avaliados quanto às taxas de enucleação (EN) em microscópio de epifluorescência (330-385nm). Foram realizadas cinco repetições.

B) Exposição à demecolcina após o desencadeamento do processo de ativação partenogenética visando à EN química total

Após 26 h de MIV, oócitos bovinos foram desnudados e ativados como descrito anteriormente, sendo o tratamento com cicloheximide (10 $\mu$ g/mL) de até 4 horas. Os seguintes grupos foram estabelecidos: controle – CON (sem ativação e sem exposição à demecolcina), ativado – ATIV (exposto apenas aos agentes ativadores) e exposto à

demecolcina – DEME (ativação por 4 h e tratamento com 0,05µg/mL de demecolcina por 2 a 4 h após 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 h do início da ativação).

Dessa forma, o tratamento DEME foi composto pelos grupos: G1 (demecolcina presente no meio entre 0 e 2 h de ativação; DEME 0 h – 2 h), G2 (DEME 0 h – 4 h), G3 (DEME 0,5 h – 2,5 h), G4 (DEME 0,5 h – 4 h), G5 (DEME 1 h – 3 h), G6 (DEME 1 h – 4 h), G7 (DEME 1,5 h – 3,5 h), G8 (DEME 1,5 h – 4 h) e G9 (DEME 2 h – 4 h).

Os oócitos foram corados com 10µg/mL de Hoechst 33342 durante 15 minutos e avaliados quanto às taxas de ativação e enucleação (EN) em microscópio de epifluorescência (330-385nm). Foram avaliadas cinco repetições neste experimento.

#### **4.2.3. Avaliação do tempo de incubação em demecolcina após 2 h da ativação para EN química total**

Com o objetivo de confirmar protocolo indicado na literatura para a enucleação química total de oócitos bovinos (FISCHER RUSSEL et al., 2005), que preconiza o tratamento com demecolcina por 2 h após 2 h de ativação, foi realizado um experimento para verificação do menor tempo de exposição à droga eficaz no processo de enucleação.

Assim, oócitos foram maturados *in vitro* por 26 h, desnudados e ativados como no experimento B. Após 2 h de ativação, os oócitos foram expostos à 0,05µg/mL de demecolcina, além do agente ativador (cicloheximide), e amostras foram obtidas após 0,25 h; 0,5 h; 1,0 h; 1,5 h e 2,0 h de tratamento. Os oócitos foram corados com Hoechst 33342 durante 15 minutos e avaliados quanto às taxas de enucleação (EN) em microscópio de epifluorescência (330-385nm), sendo realizadas neste experimento cinco repetições.

### **4.3. Experimento II – Dinâmica nuclear e de microtúbulos em oócitos ativados partenogeneticamente submetidos à EN química total**

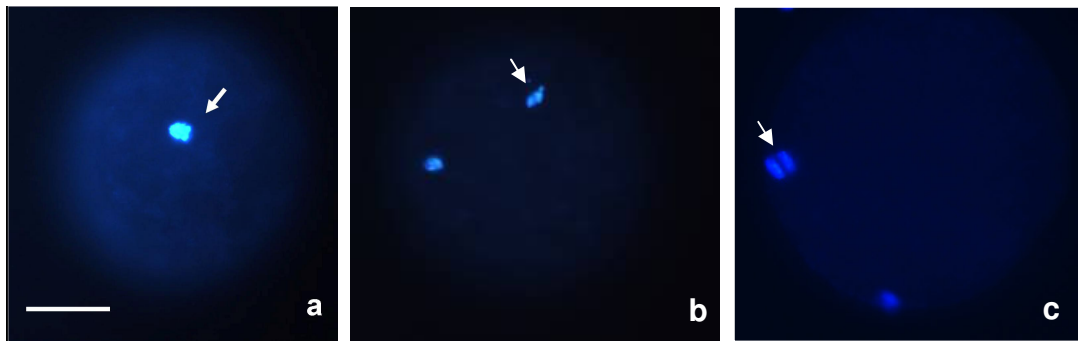
Durante o trabalho de mestrado (SARAIVA, 2006) avaliamos os efeitos da demecolcina na organização de microtúbulos em oócitos destinados à EN química parcial. Assim, no presente estudo, objetivamos avaliar os efeitos desse agente sobre o núcleo e os microtúbulos de oócitos ativados submetidos ao tratamento para EN química total.

Oócitos bovinos maturados *in vitro* por 26 h foram ativados com ionomicina e cicloheximide, como descrito anteriormente, por 2 horas, seguido pelo tratamento com demecolcina + ativação por mais 2 horas. Os oócitos foram fixados e avaliados quanto à configuração de cromatina e de fuso meiótico (microtúbulos) às 0 h (MII); 0,5 h; 1,0 h; 2,0 h; 2,5 h; 3,0 h; 4,0 h e 10 h após o início do processo de ativação. Em cada repetição foram avaliados 15 a 30 oócitos por tratamento e foram realizadas 3 repetições.

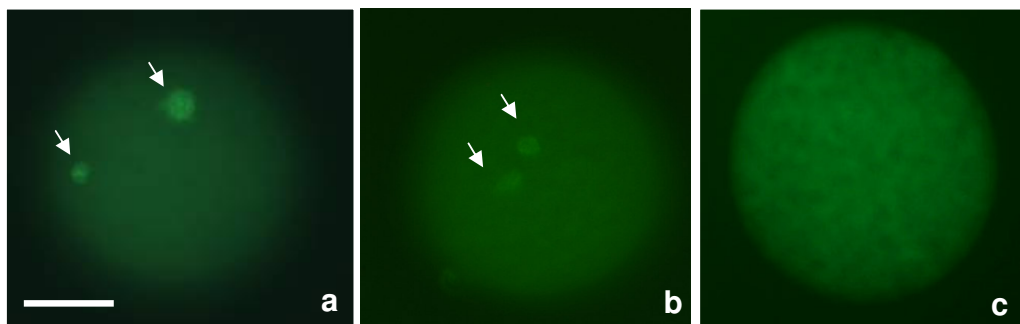
Utilizou-se a técnica descrita por Liu et al. (1998), sendo que os oócitos oriundos dos momentos mencionados permaneceram 30 minutos a 38°C em tampão estabilizador de microtúbulo (0,1M Pipes, pH 6,9; 5mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 2,5mM EGTA), com 2% de formaldeído, 0,1% de Triton X-100, 1µM de taxol, 0,01% de aprotinina, 1mM de ditiotreitol e 50% de óxido de deutério. Os oócitos foram incubados durante a noite a 4°C em meio de lavagem e incubação – MLI (PBS com 0,02% de NaN<sub>3</sub>; 0,01% de Triton X-100; 0,2% de leite em pó desnatado; 2% de BSA e 0,1M de glicina). Posteriormente, os oócitos foram incubados em MLI contendo anticorpo monoclonal de camundongo anti-α-tubulina (1:50) conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) a 38°C por 2 horas. Após serem lavados em MLI, os oócitos foram então corados com 10µg/mL de Hoechst 33342 em MLI por 10 minutos, montados em lâmina com 90% de glicerol em PBS e avaliados sob fluorescência em 330-385 e 420-490nm, quanto à configuração da cromatina e dos fusos meióticos. Quanto ao estágio nuclear, os oócitos foram classificados em: imaturos (até MI); maduros (AI/TI ou MII) e ativados (AII/TII, oócitos com extrusão do 2º CP ou presença de PN), de acordo com a Figura 1. Ainda,



os oócitos foram classificados em relação à organização dos MTs da seguinte maneira: presentes (MTs evidentes); reduzidos (MTs com redução de densidade) e ausentes (ausência completa de MTs), de acordo com a Figura 2.



**Figura 1.** Fotomicrografias de oócitos bovinos ativados tratados com demecolcina (Avaliação da dinâmica nuclear). Categorias de oócitos encontradas: (a) oócito em metáfase I (MI), (b) oócito em metáfase II (MII), (c) oócito em anáfase/telófase II (AII/TII). Oócitos corados com Hoechst 33342 e observados em microscópio de epifluorescência. As setas indicam material nuclear (azul). As barras indicam 50 $\mu$ m.



**Figura 2.** Fotomicrografias de oócitos bovinos ativados tratados com demecolcina (Avaliação da configuração de microtúbulos). Categorias de oócitos encontradas: (a) oócito com microtúbulos (MTs) presentes, (b) oócito com MTs reduzidos, (c) oócito com ausência de MTs. Oócitos corados com anticorpo anti- $\alpha$  tubulina (1:50) conjugado a FITC, observados em microscópio de epifluorescência. As setas indicam microtúbulos (verde). As barras indicam 50 $\mu$ m.

#### **4.4. Experimento III – Avaliação de atividade do Fator Promotor de Maturação (MPF) e da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) em oócitos utilizados na EN química parcial e na EN química total**

Oócitos provenientes dos dois tratamentos (EN química parcial e EN química total), conforme protocolos já definidos anteriormente nos itens 4.2.1 e 4.2.2 (grupo G9), foram analisados quanto à atividade do MPF e da MAPK, indiretamente avaliados pelo ensaio da histona 1 cinase (H1) e da proteína básica de mielina (MBP), de acordo com método descrito por Christmann et al. (1994) e Kubelka et al. (2000), em diferentes momentos após a exposição à demecolcina. Este experimento foi realizado no Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Ciências Básicas, FZEA, USP, em Pirassununga – SP.

##### **A) Preparo do gel de poliacrilamida 15%**

Inicialmente procedeu-se à elaboração do gel de poliacrilamida-SDS 15%. Para tanto, foi preparado o gel separador a 15% (Tris-HCl 1,5M, SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida, persulfato de amônia 10% e TEMED) que foi polimerizado por cerca de 30-40 min. Posteriormente, foi preparado o gel empilhador a 4% (Tris-HCl 0,5M, SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida, persulfato de amônia 10% e TEMED), que também foi polimerizado por cerca de 30 min. Após a polimerização dos géis, os mesmos foram banhados com tampão de corrida (25mM de Tris base, 192mM de glicina e 0,1% de SDS), estando aptos a receberem as amostras das reações.

##### **B) Preparo das reações para avaliação das cinases (MPF e MAPK)**

Grupos de quatro oócitos oriundos dos diferentes tratamentos: técnica EN química parcial (A) – oócitos em MII (19 h MIV) e 0,5 h; 1,0 h; 2,0 h; 4,0 h e 8,0 h após o início da exposição à demecolcina e técnica EM química total (B) – oócitos em MII (26 h MIV), e 0,5 h; 1,0 h; 2,0 h; 3,0 h; 4,0 h e 8,0 h após o início da ativação (Figura 3), foram

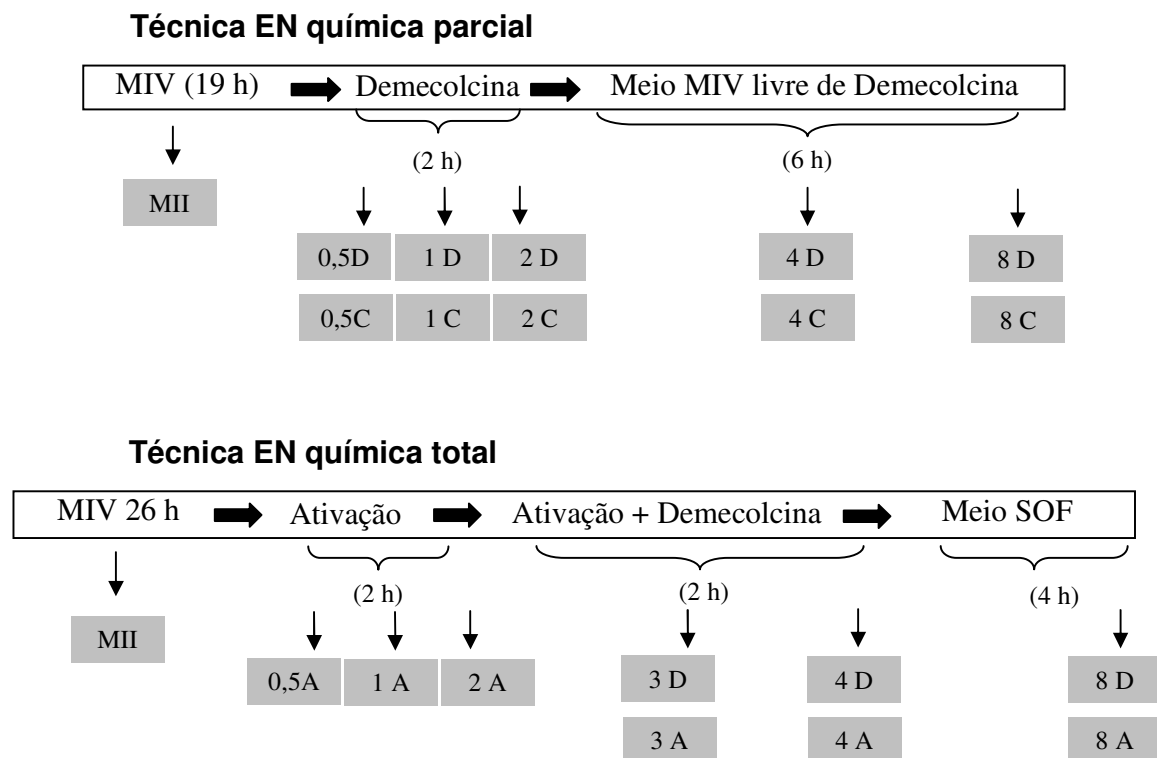
acondicionados em microtubos contendo 2 $\mu$ L de tampão de coleta (4,5mM EDTA, 10mM NaF e 10mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> em PBS) e mantidos em freezer a -80°C até a execução do ensaio. Os grupos controle foram compostos por oócitos obtidos nos mesmos momentos de tratamento, porém, cultivados em meio livre de demecolcina ou agentes ativadores.

Após a descongelação, foram adicionados a cada microtubo 3 $\mu$ L de tampão de homogeneização (100mM  $\beta$ -glicerofosfato; 25mM *p*-nitrofenilfosfato; 25mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 1,66mM DTT; 0,16mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 1,6mM PMSF; 33,3 $\mu$ g/mL leupeptina; 66,6 $\mu$ g/mL aprotinina; 41,66mM MOPS-KOH e 8,33mM EGTA), sendo a amostra incubada a 37°C por 15 min. Posteriormente, foram acondicionados em cada microtubo 4 $\mu$ L de tampão cinase (1mg/mL de histona H1; 2mg/mL de MBP; 0,55 $\mu$ M de peptídeo inibidor de proteína cinase – PKAi; 250 $\mu$ Ci/mL [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP; 75mM  $\beta$ -glicerofosfato; 18,75mM *p*-nitrofenilfosfato; 18,75mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 1,25mM DTT; 0,1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 1,2mM PMSF; 25 $\mu$ g/mL leupeptina; 50 $\mu$ g/mL aprotinina; 6,25mM MOPS-KOH e 31,25mM EGTA), e as amostras foram incubadas por 30 min a 37°C. Em seguida, foram adicionados à cada reação 9 $\mu$ L de tampão de amostra dodecil sulfato de sódio - SDS 2X concentrado (0,125M de Tris-HCl pH 6,8; 20% de glicerol; 40% de SDS; 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,005% de azul de bromofenol). Finalmente, para separação da histona H1 cinase e da MBP, marcadas radioativamente com radioisótopo P32 ou [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (Perkin Elmer, Waltham, USA), as amostras foram levadas ao banho seco por 5 min a 90-100°C, objetivando-se a linearização das proteínas.

Após esse período, 15 $\mu$ L de cada amostra foram colocados em gel 15% poliacrilamida SDS-1D (LAEMMLI, 1970) para eletroforese, com corrente inicial de 120 V por 15 min para empilhamento e 180 V para corrida, por aproximadamente 40 minutos. Após a eletroforese, o gel foi colocado em solução de secagem (3% de glicerol e 30% de metanol) por 20 min sob agitação e transferido para uma secadora à temperatura de 80°C por 1 h, para desidratação. Posteriormente, o gel foi autoradiografado por 12 a 24 h (Hyperfilm<sup>TM</sup>MP, Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden).

A atividade das cinases foi quantificada por densitometria de bandas no filme auto-radiográfico, com auxílio do software Image Master 2D Platinum 6.0 (Amersham

Biosciences), que avaliou a intensidade das bandas como uma contagem em pixels. Determinou-se arbitrariamente a atividade em oócitos MII como 100% e assim, as atividades das demais amostras foram determinadas como uma proporção desse valor. Os ensaios foram realizados em três repetições e cada amostra continha quatro oócitos.



**Figura 3.** Modelo esquemático para obtenção dos grupos referentes à técnica A (EN Parcial) – oócitos em MII e após 0,5 h; 1,0 h; 2,0 h; 4,0 h e 8,0 h do início da exposição à demecolcina e dos grupos referentes à técnica B (EN Total) – oócitos em MII e após 0,5 h; 1,0 h; 2,0 h; 3,0 h; 4,0 h e 8,0 h do início da ativação, sendo o tratamento com demecolcina aplicado entre 2 e 4 h do processo de ativação. (C) – controle; (A) – ativado; (D) – exposto à demecolcina.

#### **4.5. Experimento IV – Avaliação da eficiência de diferentes técnicas de enucleação oocitária, desenvolvimento inicial e expressão gênica em embriões reconstituídos por TN a partir de citoplastos oriundos de EN química**

Para avaliação da influência de diferentes técnicas de enucleação sobre o desenvolvimento inicial e expressão gênica de embriões reconstituídos, foram obtidos os seguintes grupos: *in vitro*, *in vivo* e partenogenético (grupos controle); reconstituído por TN com células embrionárias a partir de três técnicas de EN: convencional, parcial e total; e reconstituídos por TN com células adultas, utilizando as técnicas de EN convencional e parcial. Em todos os grupos, foram avaliados embriões dos sexos feminino (F) e masculino (M).

##### **4.5.1. Produção *in vitro* de embriões sexados**

A obtenção, seleção e maturação dos oócitos se deram de acordo com o item 4.1. Foram cultivados 15 oócitos em gotas de 100µL de meio MIV, cobertas por óleo mineral.

Após a maturação, as células do *cumulus* foram parcialmente removidas dos oócitos por pipetagem, e grupos de 15 oócitos foram lavados duas vezes e transferidos para gotas de 30µL de meio TALP-FIV suplementado com 0,6% de BSA, 10µg/mL de heparina, 18µM de penicilamina, 10µM de hipotaurina, 1,8µM de epinefrina, 0,2mM de piruvato e 83,4 µg/mL de amicacina, cobertas com óleo mineral estéril. Palhetas congeladas de sêmen do mesmo touro sexado para X e para Y por citometria de fluxo (Lagoa da Serra, Sertãozinho, Brazil), que fornece acurácia acima de 90% (SEIDEL et al., 1999; HAMANO, 2007), foram utilizadas. O sêmen foi descongelado a 35°C por 30 segundos e cada palheta, contendo aproximadamente dois milhões de espermatozóides, foi centrifugada separadamente em gradiente de Percoll descontínuo 45%/90% por 7 min a 3.600 *xg*. O pellet foi ressuspensionado em 500µL de meio TALP-FIV e centrifugado novamente por 5 min a 520 *xg*. Após a centrifugação, 100µL de meio incluindo o pellet foram coletados do fundo do tubo, e homogeneizados em um tubo cônico. A suspensão final foi distribuída entre 10 gotas contendo os oócitos. Assim,

foram inseminados 150 oócitos a partir de cada palheta de sêmen sexado. O período de co-incubação de oócitos e espermatozóides, a 38,5-39°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar, foi de 18-20 h.

Após esse período, as células do *cumulus* foram removidas por pipetagem e os embriões produzidos foram submetidos ao cultivo de desenvolvimento em gotas de 100µL de meio SOF suplementado com 2,5% de SFB e 5mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos, que permaneceram cobertas com óleo mineral, à temperatura de 38,5-39°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, até os procedimentos de avaliação. A cada 48 h, foi realizado o “feeding”, ou seja, a substituição de 50µL do meio SOF das gotas de desenvolvimento por meio SOF recém-preparado. As taxas de clivagem e blastocistos foram avaliadas 48 h e 7 dias após o início da FIV, respectivamente.

Os embriões produzidos, separados por sexo de acordo com o sêmen utilizado, foram lavados três vezes em PBS + 0,1% de PVA e então, congelados individualmente em microtubos de 0,2mL contendo solução PBS + 0,1% PVA + 1U/µL de inibidor de RNase em volume total de 1,0µL. Os microtubos foram imersos diretamente em nitrogênio líquido a -196°C e armazenados a -80°C para avaliação da expressão gênica do grupo controle *in vitro* e padronização das técnicas de biologia molecular.

#### **4.5.2. Superovulação e coleta de embriões *in vivo***

Embriões produzidos *in vivo* foram obtidos após superovulação e inseminação artificial (IA) de fêmeas bovinas cruzadas *Bos indicus/B. taurus* apresentando ciclicidade ovariana. As ondas foliculares foram sincronizadas pela aspiração do folículo dominante e inserção de dispositivo de liberação de progesterona (P4) (Crestar, Intervet Internation GmbH, Unterschleissheim, Alemanha). A quantidade total de 220mg de FSH (Pluset, Calier, Espanha) foi administrada IM em oito doses decrescentes, duas vezes ao dia, por quatro dias consecutivos (40mg x 2, 30mg x 2, 20mg x 2, 20mg x 2, respectivamente), com início 3 dias após a aspiração do folículo dominante. Para indução de luteólise, concomitante à quinta ou sexta dose de FSH, 150µg de um análogo de prostaglandina F2α (D-cloprostenol, Croniben, E.H.G Agrofarma) foi

administrado IM. A remoção do dispositivo de liberação de P4 foi realizada no momento da sexta aplicação de FSH. Finalmente, 0,1mg de hormônio liberador de LH (Gestran Plus, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) foi administrado i.m. concomitantemente ao início da manifestação do cio para induzir o pico de LH. Os animais foram inseminados com sêmen sexado, acompanhando-se o início das ovulações. Foram realizadas três inseminações, sendo a primeira IA com uma palheta e a segunda IA com duas palhetas.

No sétimo dia do desenvolvimento (IA=dia 0), os embriões foram recuperados, não-cirurgicamente, por lavagem uterina com solução salina com tampão fosfato (PBS) e congelados individualmente em microtubos de 0,2mL contendo solução PBS + 0,1% PVA + 1U/ $\mu$ L de inibidor de RNase, em volume total de 1,0 $\mu$ L. Os microtubos foram imersos em nitrogênio líquido a -196°C e armazenados a -80°C para posterior avaliação da expressão gênica (grupo controle *in vivo*).

#### **4.5.3. Obtenção de embriões partenogênicos**

Para a obtenção de embriões partenogênicos (grupo parteno), oócitos maturados *in vitro* por 26 horas foram desnudados e ativados com 5 $\mu$ M de ionomicina por 5 minutos, seguido de cultivo em meio SOF contendo cicloheximide (10 $\mu$ g/mL) e citocalasina (10 $\mu$ g/mL) por 5 horas. Posteriormente, foram realizadas várias lavagens dos oócitos e os mesmos foram cultivados em meio SOF, como descrito anteriormente para embriões produzidos *in vitro*.

No sétimo dia, os embriões foram lavados três vezes em PBS + 0,1% de PVA e congelados individualmente em microtubos de 0,2mL contendo solução PBS + 0,1% PVA + 1U/ $\mu$ L de inibidor de RNase em volume total de 1,0 $\mu$ L. Os microtubos foram imersos em nitrogênio líquido a -196°C e armazenados a -80°C para avaliação da expressão gênica do grupo controle parteno.

#### **4.5.4. Clonagem por transferência nuclear (TN) de células embrionárias**

##### **4.5.4.1. Técnicas de enucleação oocitária (EN)**

###### **A) Técnica convencional**

Após 18 a 20 h do início da maturação *in vitro*, os oócitos foram desnudados, conforme já descrito anteriormente. Os oócitos desnudos foram incubados por 30 minutos a 38,5°C em meio SOF (“Synthetic Oviduct Fluid”) com tampão HEPES (HSOF) e 10% de SFB suplementado com 7,5µg/mL de citocalasina B e 7,5µg/mL de Hoechst 33342. Após incubação, os oócitos foram transferidos para uma gota de micromanipulação contendo meio HSOF e 10% de SFB, suplementado com 7,5µg/mL de citocalasina B. A enucleação dos oócitos foi realizada somente em oócitos que apresentavam o primeiro corpúsculo polar (CP), em microscópio óptico invertido (Olympus IX-70) e sobre uma placa aquecedora à temperatura de 37°C, removendo-se o 1º CP e porção de citoplasma adjacente com auxílio de micropipeta de injeção. A enucleação foi confirmada expondo-se o oócito à luz ultravioleta para verificação da presença ou ausência da placa metafásica.

###### **B) Técnica de EN química parcial:**

Após 18 a 19 horas de maturação, os oócitos foram desnudados e, em seguida, submetidos ao tratamento com demecolcina (0,05µg/mL) por 2 horas, completando-se 20 a 21 horas de maturação. Os oócitos foram então lavados três vezes em meio HSOF com 10% de SFB e transferidos para uma gota de micromanipulação contendo meio HSOF com 10% de SFB suplementado com 7,5µg/mL de citocalasina B, procedendo-se a enucleação apenas em oócitos com formação de protrusão e extrusão do 1º CP. Em seguida, parte dos citoplastos foi fixada em paraformaldeído 4% por 1 h em temperatura ambiente, e armazenada em PBS + PVP 1%, para posterior verificação da eficácia da enucleação por meio de coloração com Hoechst 33342. O restante dos citoplastos foi submetido à TN.



### **C) Técnica de EN química total:**

Após 26 horas de MIV, os oócitos foram desnudados e ativados artificialmente com incubação em meio HSOF com 10% de SFB contendo 5 $\mu$ M de ionomicina por 5 min e em 10 $\mu$ g/mL de cicloheximide em meio SOF, por 5 horas, a 38,5-39°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 1,5 h do início da ativação, os oócitos foram expostos à demecolcina (0,05 $\mu$ g/mL) até serem completadas 5,0 h de ativação, visando-se à extrusão de todo o material nuclear do oócito junto ao 2º CP. Após o término do tratamento, o 2º CP e pequena parte de citoplasma adjacente foram retirados por micromanipulação. Posteriormente, alguns prováveis citoplastos foram fixados em paraformaldeído 4% por 1 h em temperatura ambiente e armazenados em PBS + PVP 1%, para posterior verificação da eficácia da enucleação, conforme descrito anteriormente, e o restante dos citoplastos submetido à TN.

#### **4.5.4.2. Obtenção de células embrionárias doadoras de núcleo**

Embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado para fêmeas e machos foram cultivados até o quinto dia após a fecundação. Quando foram realizadas as técnicas de enucleação convencional ou química parcial, que preconizam o uso de oócitos em MII, os embriões destinados à TN foram cultivados em meio SOF contendo 0,4 $\mu$ g/mL de demecolcina por 12 h, com o objetivo de sincronização das células no estágio de metáfase. Aproximadamente três horas antes do início da micromanipulação, os embriões foram lavados várias vezes e cultivados em meio SOF livre de demecolcina, de maneira que no momento do uso, as células embrionárias encontravam-se em G<sub>1</sub>, estágio compatível com oócitos que possuem alta atividade de MPF. Quando foi realizada a técnica de EN química total, na qual oócitos ativados são utilizados e, portanto, com baixa atividade de MPF, os embriões não foram sincronizados, já que cerca de 80% dos mesmos encontram-se naturalmente em fase S do ciclo celular (CAMPBELL et al., 1996).

No momento do uso, os embriões tiveram a zona pelúcida removida em solução de pronase 0,5% durante 30 segundos. Em seguida, foram transferidos para microgotas de PBS livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> com 0,3% de PVA, onde tiveram seus blastômeros

desagregados com auxílio de pipetagem. Foram utilizados blastômeros oriundos de mórulas no estágio inicial e mórulas compactas. Os blastômeros foram incubados durante 30 minutos em 7,5µg/mL de citocalasina B antes de serem transferidos para a gota de micromanipulação e utilizados como células embrionárias doadoras de núcleo.

#### **4.5.4.3. Reconstituição embrionária**

Células embrionárias foram individualmente transferidas para o espaço perivitelínico de cada citoplasto receptor e os complexos citoplasto-célula foram eletrofundidos em solução de manitol 0,3M contendo 0,05mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,1mM de MgSO<sub>4</sub> e 0,1% de PVA. A eletrofusão foi induzida por um pulso direto de 1,5kV/cm com duração de 70µs (BORDIGNON et al., 1999). As taxas de fusão foram determinadas 30 a 60 minutos após a eletrofusão, e os oócitos reconstituídos com sucesso foram incubados em SOF + 10% de SFB a 38,5°C sob atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

#### **4.5.4.4. Ativação partenogenética das estruturas reconstituídas**

As estruturas nas quais foi observada adequada fusão das células doadoras foram quimicamente ativadas utilizando 5µM de ionomicina por 5 minutos em HSOF suplementado com 10% de SFB e 10µg/mL de cicloheximide+10µg/mL de citocalasina B em meio SOF com 10% de SFB por 5 horas a 38,5°C, sob atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Apenas estruturas reconstituídas advindas das técnicas convencional e química parcial foram ativadas ao final do processo, já que na técnica de enucleação química total a ativação é realizada no início do protocolo.

#### **4.5.4.5. Cultivo embrionário *in vitro***

O cultivo embrionário foi realizado em microgotas de 100µL de SOF contendo 5mg/mL de BSA livre de ácidos graxos e 2,5% de SFB cobertas por óleo mineral. A cada 48 horas, o “feeding” era realizado pela substituição de 50% do volume da microgota por meio recém-preparado. Grupos de aproximadamente 10 embriões foram cultivados em cada microgota a 38,5°C sob atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. As taxas de clivagem e de produção de blastocistos foram avaliadas após o cultivo por 48

h e 7 dias, respectivamente. Os embriões foram então congelados individualmente em microtubos de 0,2mL contendo solução PBS + 0,1% PVA + 1U/ $\mu$ L de inibidor de RNase em volume total de 1,0 $\mu$ L. Os microtubos foram imersos em nitrogênio líquido a -196°C e armazenados a -80°C.

#### **4.5.5. Clonagem por transferência nuclear (TN) de células somáticas**

Embriões no estágio de blastocisto, reconstituídos com células somáticas (fibroblastos) a partir de duas técnicas de enucleação (convencional e química parcial) produzidos por Saraiva et al. (2006) e que se encontravam armazenados em freezer -80°C foram utilizados em experimento seguinte para avaliação de expressão gênica.

De modo resumido, no processo de reconstrução embrionária, oócitos bovinos obtidos de ovários de matadouro foram utilizados como fonte doadora de citoplasma, enquanto linhas celulares de fibroblastos, estabelecidas a partir de biópsias de pele de fêmea bovina da raça Nelore foram usadas como fonte doadora de núcleo. Na técnica convencional, após a maturação *in vitro* (MIV), os complexos *cumulus*-oócitos foram desnudados em hialuronidase, incubados por 30min em 5mg/mL de bisbenzimidazole (Hoechst 33342) e 7,5mg/mL de citocalasina B, enucleados em estágio de metáfase II em microscópio óptico invertido, removendo-se o primeiro corpúsculo polar e parte do citoplasma adjacente, confirmando-se a enucleação por meio da exposição do material aspirado no interior da pipeta à luz ultravioleta. Na técnica de enucleação química parcial, oócitos maturados *in vitro* por 19 h foram desnudados e expostos à demecolcina por 2 h, quando então se procedeu a enucleação naqueles oócitos que apresentavam a formação de uma protrusão.

Oócitos enucleados tiveram inserido no espaço perivitelíneo uma célula somática (fibroblasto). O processo de fusão celular da célula doadora de núcleo com o citoplasma foi realizado por eletrofusão em solução de manitol (0,28M) e as estruturas reconstituídas foram ativadas com ionomicina (5 $\mu$ M / 5min) e 6-dimetilaminopurina (6-DMAP – 2mM / 4h). Após o cultivo *in vitro* em meio de desenvolvimento SOF, avaliou-se a taxa de clivagem e a produção de blastocistos ao sétimo dia. Os embriões foram então congelados individualmente em microtubos de 0,2mL contendo solução PBS +

0,1% PVA + 1U/ $\mu$ L de inibidor de RNase em volume total de 1,0 $\mu$ L. Os microtubos foram imersos em nitrogênio líquido a -196°C e armazenados a -80°C.

#### 4.5.6. Extração do RNA total dos embriões

Noventa e quatro blastocistos (5 a 10 de cada grupo: *in vitro* F e M; *in vivo* F e M; partenogênético; TN a partir de células embrionárias - EN convencional F e M, EN química parcial F e M e EN química total F e M; TN a partir de células adultas - EN convencional F e EN química parcial F) foram individualmente submetidos à extração de RNA com Trizol (Invitrogen, Brasil) de acordo com as sugestões do fabricante, com algumas modificações.

Cada amostra foi descongelada em um bloco de gelo e homogeneizada em 100 $\mu$ L de Trizol acrescidos de 5 $\mu$ g/mL de acrilamida linear (Ambion) e 9 $\mu$ L de água DEPC, sendo incubada por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, foram adicionados 20  $\mu$ L de clorofórmio (Merck & Co.), procedendo-se a inversão do tubo várias vezes, para que houvesse adequada separação das fases. Após 3 minutos de incubação a TA, as amostras foram centrifugadas a 12.000  $xg$  por 15 minutos a 4°C, e então, foram transferidos 50 $\mu$ L do sobrenadante para novos tubos, aos quais foram adicionados 70 $\mu$ L de álcool isopropílico para precipitação do RNA. Procedeu-se nova incubação a TA por 10 minutos e a -20°C por mais 10 minutos ou overnight. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e o “pellet” de RNA lavado em 100 $\mu$ L de etanol (Merck & Co.) 75% (v/v), sendo realizada a centrifugação dos tubos a 7.500  $xg$  por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido novamente e o RNA permaneceu por no mínimo 15 minutos a TA para secagem, sendo posteriormente eluído em 5 $\mu$ L de água livre de RNase (DEPC).

#### 4.5.7. Transcrição reversa

Imediatamente após a extração de RNA, as amostras foram submetidas à síntese do DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa, utilizando-se o kit *ImPron-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase* (Promega, Madison, WI, EUA). Para tanto, os microtubos contendo os embriões foram incubados por 5 minutos a 70°C com 0,5 $\mu$ L de

oligo-dT (0,5µg/mL) e imediatamente resfriados a 4°C para adição de 2,0µL de tampão de reação 5X, 1,2µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,5µL de dNTP (10 mM de cada), 0,5µL de inibidor de RNase (1U/µL – Invitrogen) e 0,5µL de enzima transcriptase reversa, em um volume de 10µL. As amostras foram incubadas a 42°C por 60 minutos, e a seguir a 70°C por 15 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento da pré-amplificação.

#### **4.5.8. Pré-amplificação do cDNA**

Cada amostra de cDNA foi pré-amplificada para os transcritos de interesse, utilizando-se o kit TaqMan PreAmp Master Mix (2X) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Inicialmente foi preparada uma mistura contendo 450nM de cada primer. Após a devida homogeneização da mistura, foi adicionado 1µL da mesma em um microtubo contendo 4µL de cDNA. Em seguida, foram acrescentados 5µL de TaqMan PreAmp Master Mix, totalizando um volume final de 10µL. Os microtubos foram aquecidos a 95°C por 10 minutos e submetidos a 14 ciclos de 95°C/15seg, 57°C/45seg e 60°C/4min em um termociclador. Posteriormente, as amostras foram avaliadas quantitativamente quanto à concentração (ng/µL) e pureza (relação entre as densidades ópticas de 260/280nm) por espectrofotometria, utilizando-se o equipamento Nanodrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA), e armazenadas a -20°C até o momento da realização da PCR em tempo real.

#### **4.5.9. PCR em tempo real**

As análises em PCR em tempo real foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos – SP. Os transcritos de interesse foram quantificados a partir das amostras de cDNA pré-amplificadas, utilizando-se um ensaio de quantificação relativa por PCR em tempo real (Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System). Em todas as reações de PCR em tempo real foi utilizado o corante ROX como referência passiva e para detecção do DNA o corante SYBR Green (Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG, Invitrogen). As reações foram realizadas em triplicata, em um volume final de 20µL, contendo 0,2µM de cada par de oligonucleotídeos iniciadores para o *GAPDH*, *G6PD* e *HSPA1A* e 0,1µM de

cada par de oligonucleotídeos iniciadores para o *XIST*. A reação teve início com incubação a 50°C por 2 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 10 minutos e 60 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A curva de dissociação foi iniciada em 60°C com +0,1°C de incremento até atingir 95°C. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na quantificação dos genes *XIST*, *G6PD* e *HSPA1* e controle endógeno (*GAPDH*), sintetizados pela Prodimol, estão descritos na Tabela 1. Para cada amostra avaliada quanto aos genes *XIST* e *G6PD*, o cDNA foi diluído 1:5 vezes para ser utilizado nas reações, enquanto para as amostras avaliadas quanto ao gene *HSPA1* o cDNA foi diluído 1:2 vezes.

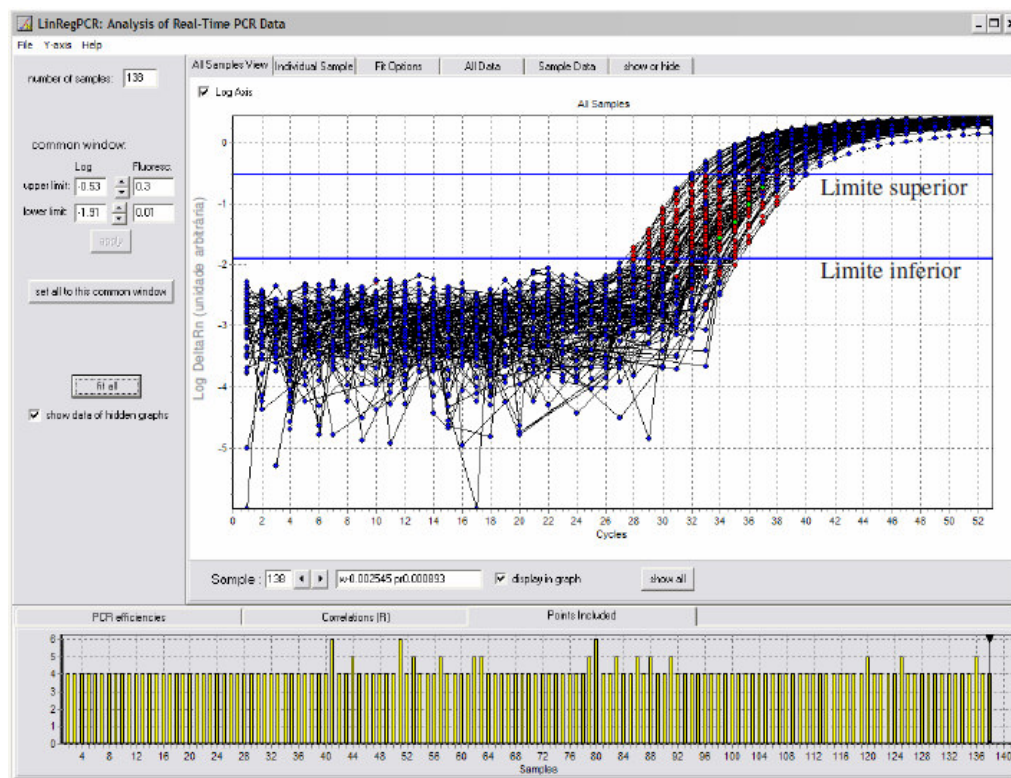
**Tabela 1.** Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação relativa dos genes *XIST*, *G6PD* e *HSPA1A* e códigos de acesso no GenBank.

Gene	Seqüência (5' → 3')	pb	GenBank
<b>GAPDH</b>			
Direto	AAGGCCATCACCATCTTCCA	76	NM_001034034
Reverso	CCACTACATACTCAGCACCAGCAT		
<b>XIST</b>			
Direto	TTGGCTTTTAGATTAATTTGATGAACAGCAT	99	NR_001464
Reverso	CCCTTTAGACTAGGCCCATTTTCATA		
<b>G6PD</b>			
Direto	GCCGTCCTCTATGTGGAAAATGA	58	XM_583628
Reverso	CGCAGCGCAGGATGAAG		
<b>HSPA1A</b>			
Direto	RIBEIRO et al. (2009)		
Reverso			

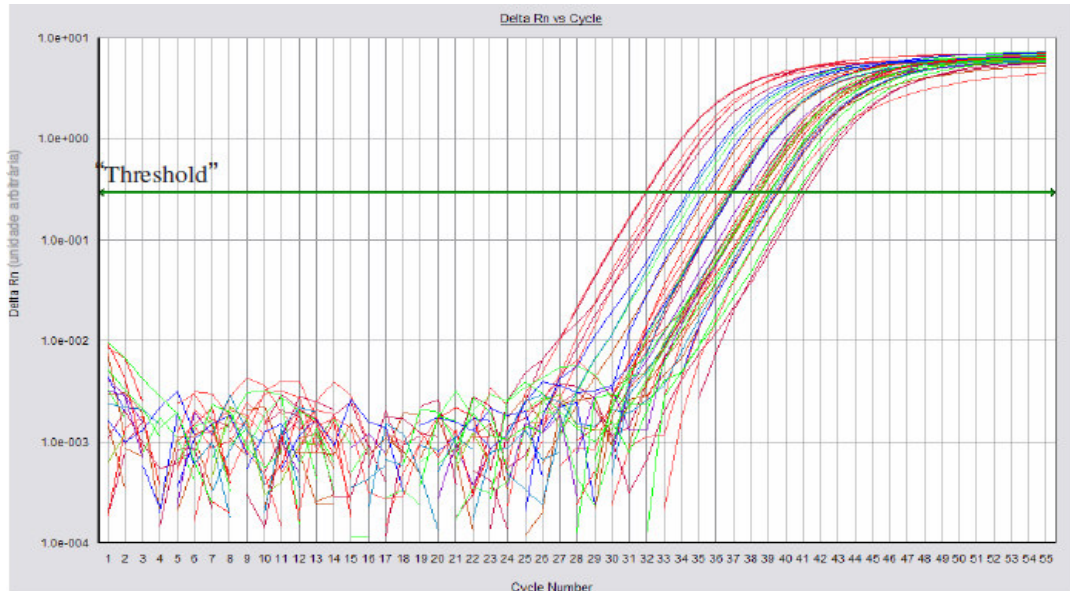
#### 4.12. Análise dos dados da PCR

A eficiência média das amplificações por PCR foi estimada para cada par de oligonucleotídeos iniciadores em cada amostra utilizando uma regressão linear do logaritmo da fluorescência a cada ciclo (RAMAKERS et al., 2003), através do programa LinRegPCR (Figura 4). Cada curva de regressão foi ajustada para conter no mínimo 4 e no máximo 6 pontos, mantendo sempre um coeficiente de regressão linear máximo.

Após constatação de equivalência das eficiências de amplificação entre genes alvo e gene de referência, utilizou-se o método  $C_T$  comparativo ( $\Delta\Delta C_T$ ) com auxílio do software SDS v1.4. Para cada par de oligonucleotídeos iniciadores, a linha de “threshold” foi fixada no ponto médio da janela de linearidade, que corresponde à fase em que as amostras estão sofrendo amplificação exponencial (Figura 5).



**Figura 4.** Exemplo de curva de regressão linear utilizando o programa LinReg para cálculo das eficiências individuais das reações de PCR. Os pontos incluídos entre os limites superior e inferior da janela de linearidade foram utilizados nos cálculos da eficiência e da correlação da curva.



**Figura 5.** Exemplo de curvas de amplificação por PCR em tempo real e linha de “threshold”, que corresponde ao ponto médio da janela de linearidade (região de amplificação exponencial). O ponto em que as curvas de amplificação cruzam a linha de “threshold” corresponde ao ciclo do “threshold” (Ct).

#### 4.6. Análise Estatística

As taxas de formação de protrusão, ativação e enucleação avaliadas no experimento I, e as taxas de eficiência das técnicas de enucleação, e de desenvolvimento no experimento IV foram avaliadas pelo teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) ou, quando apropriado, pelo teste exato de Fisher.

No experimento II, os resultados dos diferentes grupos quanto à porcentagem de categorias foram submetidos à ANOVA, e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Para a avaliação da histona 1 cinase e MBP no experimento III, os resultados obtidos após as transformações dos valores de intensidade em proporções foram submetidos à ANOVA, considerando os grupos controle e tratado, os diferentes



momentos, além das interações entre esses fatores. O procedimento utilizado foi o PROC GLM, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Todas as análises descritas foram realizadas pelo programa “Statistical Analysis System” (SAS), versão 9.1, ao nível de significância de 5%.

Quanto à avaliação da expressão gênica no experimento IV, as diferenças relativas entre os grupos para cada gene estudado (*XIST*, *G6PD* e *HSPA1A*) foram estimadas tendo o GAPDH como gene de referência. Foi utilizado o teste não paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso (“Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test”) utilizando o “Relative Expression Software Tool” (REST; PFAFFL et al., 2002). A hipótese nula ( $H_0$ ) foi a de ausência de diferenças entre os grupos, enquanto que as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas caso a probabilidade da hipótese alternativa [ $P(H_1)$ ] fosse inferior a 0,05.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Experimento I – Padronização das condições de cultivo em demecolcina de oócitos bovinos submetidos à EN química parcial e à EN química total**

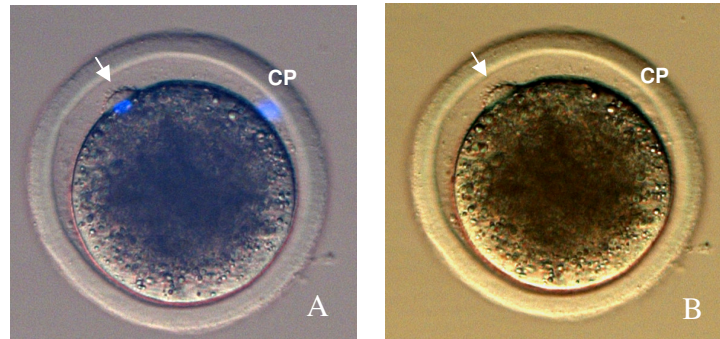
O objetivo deste experimento foi padronizar as melhores condições para exposição de oócitos em MII ou ativados à demecolcina, visando, posteriormente, ao fornecimento de citoplastos viáveis para a transferência nuclear (TN).

#### **5.1.1. Avaliação do tempo de incubação de oócitos em MII em demecolcina para a EN química parcial**

A maioria dos trabalhos cita a utilização da demecolcina por 2 h, para que seja visualizada a protrusão na superfície do oócito. Assim, como complementação ao trabalho de mestrado, avaliou-se no primeiro experimento deste trabalho o menor tempo eficaz de incubação de oócitos bovinos em demecolcina, visando à obtenção do protocolo ideal, que submeta o oócito à menor concentração e ao menor tempo necessários pra que se obtenha o efeito de formação de protrusão desse agente desestruturador de microtúbulos.

Quanto aos resultados obtidos, efeitos do tratamento (formação de protrusões; Figura 6) já foram observados a partir de 15 minutos de incubação em demecolcina, sendo que o grupo 0,25 h DEME diferiu significativamente dos grupos 0 h e 0,25 h CON. Não foi observada diferença ( $p>0,05$ ) entre os grupos expostos à demecolcina entre 0,25 e 0,5 h (Tabela 2).

Os maiores valores numéricos foram obtidos a partir de 1,0 h de tratamento, sendo que esse grupo não diferiu estatisticamente dos grupos 1,5 h DEME e 2,0 h DEME (Tabela 2). Assim, conclui-se que o processo de enucleação pode ser iniciado após 1,0 h de exposição à demecolcina.



**Figura 6.** Fotomicrografias de oócitos bovinos tratados em MII com demecolcina, apresentando formação de protrusão na região cortical. Presença do 1º CP e protrusão (indicada pela seta), observados com (A) ou sem fluorescência (B). Aumento 200X.

**Tabela 2.** Taxas de formação de protrusão (PR) (média  $\pm$  dp) em oócitos bovinos em MII expostos a 0,05  $\mu$ g/mL de demecolcina por 0,25 h; 0,5 h; 1,0 h; 1,5 h e 2,0 h. CON – grupo controle; DEME – grupo tratado pela demecolcina.

Tempo	No. PR (%)	No. TOTAL
0 h	16 (13,8 $\pm$ 2,4) <sup>a</sup>	116
0,25 h CON	12 (10,7 $\pm$ 0,5) <sup>a</sup>	112
0,25 h DEME	33 (28,9 $\pm$ 1,5) <sup>b</sup>	114
0,5 h CON	18 (16,2 $\pm$ 0,9) <sup>a</sup>	111
0,5 h DEME	39 (35,5 $\pm$ 2,7) <sup>b,c</sup>	110
1,0 h CON	15 (13,3 $\pm$ 1,4) <sup>a</sup>	113
1,0 h DEME	45 (40,5 $\pm$ 2,5) <sup>b,c,d</sup>	111
1,5 h CON	17 (14,9 $\pm$ 0,9) <sup>a</sup>	114
1,5 h DEME	48 (44,0 $\pm$ 3,3) <sup>c,d</sup>	109
2,0 h CON	15 (13,6 $\pm$ 2,5) <sup>a</sup>	110
2,0 h DEME	73 (52,5 $\pm$ 7,6) <sup>d</sup>	139

<sup>a,b,c,d</sup> Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.2. Avaliação de diferentes condições de cultivo para a EN química total

A) Exposição à demecolcina no início do processo de ativação partenogenética visando a EN química total

Neste experimento, foram avaliadas as taxas de enucleação (EN) após a exposição de oócitos à ativação e demecolcina por 4 ou 5 horas.

No início da avaliação (0 h) a maioria dos oócitos apresentava-se em metáfase II (MII; 133/163 – 81,6%). Os grupos ATIV e DEME por 4 ou 5 h apresentaram diminuição significativa de oócitos em MII, em decorrência do aumento das taxas de ativação e enucleação, respectivamente (Tabela 3).

Em relação à taxa de ativação, observou-se aumento significativo nos grupos ativados (ATIV) por 4 ou 5 h (97/158 – 61,4% e 100/157 – 63,7%, respectivamente), que foram similares entre si, porém superiores aos grupos tratados com demecolcina (DEME) (Tabela 3).

Quanto à taxa de enucleação, o grupo DEME por 4 h (58/147 – 39,45%) foi superior ( $p < 0,05$ ) aos grupos CON (0/150) e ATIV (7/158 – 4,43%) no mesmo momento avaliado, que também diferiram ( $p < 0,05$ ) entre si. O mesmo padrão foi observado após 5 h de tratamento, com o grupo DEME (64/151 – 42,38%) sendo superior ( $p < 0,05$ ) aos grupos CON (0/159) e ATIV (13/157 – 8,28%), que mais uma vez apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) entre si (Tabela 3). Porém, os grupos DEME com 4 ou 5 horas foram similares entre si ( $p > 0,05$ ), mostrando que o tratamento já pode ser interrompido a partir de 4 h de ativação e exposição à droga.

**Tabela 3.** Taxa de óocitos em metáfase II (MII), ativados (com presença do 2º CP) e enucleados (EN) no grupo controle (CON), após ativação (ATIV) com 5µM de ionomicina por 5 min e 10µg/mL de cicloheximide ou ativação e exposição à demecolcina (DEME) por 0, 4 e 5 horas.

Tempo	Tratamento	No. Óocitos em MII (%)	No. Ativados (2ºCP) (%)	No. Óocitos EN (%)	No. Total
0 h	-	133 (81,6%) <sup>a</sup>	02 (1,3%) <sup>c</sup>	01 (0,6%) <sup>c</sup>	163
	CON	121 (80,7%) <sup>a</sup>	04 (2,7%) <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	150
4 h	ATIV	31 (19,6%) <sup>b</sup>	97 (61,4%) <sup>a</sup>	07 (4,4%) <sup>b</sup>	158
	DEME	26 (17,7%) <sup>b</sup>	53 (36,0%) <sup>b</sup>	58 (39,4%) <sup>a</sup>	147
5 h	CON	126 (79,2%) <sup>a</sup>	05 (3,1%) <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	159
	ATIV	34 (21,6%) <sup>b</sup>	100 (63,7%) <sup>a</sup>	13 (8,3%) <sup>b</sup>	157
	DEME	29 (18,9%) <sup>b</sup>	47 (30,7%) <sup>b</sup>	64 (41,8%) <sup>a</sup>	153

<sup>a,b,c</sup>Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

B) Exposição à demecolcina após o desencadeamento do processo de ativação partenogenética visando à EN química total

Após a constatação de interferência da demecolcina no processo de ativação, levando a baixas taxas de enucleação (39,4 a 41,8%) no experimento anterior, avaliou-se neste experimento a adição da droga no decorrer do processo de ativação, ou seja, em vários momentos após a ativação ter sido desencadeada. Assim, vários grupos foram estabelecidos, como descrito na metodologia.

Considerando a taxa de ativação abrangendo todos os óocitos que apresentaram extrusão do 2º CP, inclusive os óocitos enucleados, observou-se que a demecolcina não apresentou ação prejudicial ao processo de ativação, quando foi adicionada ao meio após 1,5 h do início do processo, já que não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos 7 (DEME 1,5 h – 3,5 h), 8 (DEME 1,5 h – 4 h) e 9 (DEME 2 h – 4 h) e o grupo apenas submetido à ativação (médias entre 62,7 e 77,0%) (Tabela 4).

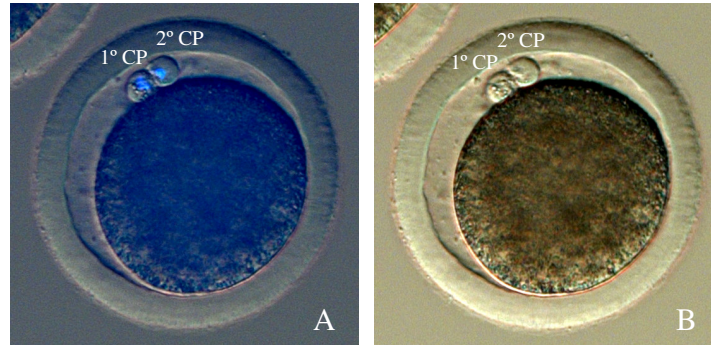
**Tabela 4.** Taxa de oócitos ativados após incubação em meio contendo 5 $\mu$ M de ionomicina por 5 min e 10  $\mu$ g/mL de cicloheximide por 4 h e diferentes tempos de tratamentos com demecolcina (DEME): Grupo 1 (DEME 0 h – 2 h); Grupo 2 (DEME 0 h – 4 h); Grupo 3 (DEME 0,5 h – 2,5 h); Grupo 4 (DEME 0,5 h – 4 h); Grupo 5 (DEME 1 h – 3 h); Grupo 6 (DEME 1 h – 4 h); Grupo 7 (DEME 1,5 h – 3,5 h); Grupo 8 (DEME 1,5 h – 4 h); Grupo 9 (DEME 2 h – 4 h). CON – controle; ATIV – ativado.

Tratamentos	Tempo (h)	No. Ativados (2 <sup>o</sup> CP) (%)	No. Total
<b>CON</b>	-	01 (0,9)*	114
<b>ATIV</b>	-	97 (74,6) <sup>ab</sup>	130
<b>Grupo 1</b>	0 - 2	42 (38,9)*	108
<b>Grupo 2</b>	0 - 4	36 (32,7)*	110
<b>Grupo 3</b>	0,5 – 2,5	59 (54,1)*	109
<b>Grupo 4</b>	0,5 – 4	56 (48,7)*	115
<b>Grupo 5</b>	1 – 3	69 (59,0)*	117
<b>Grupo 6</b>	1 – 4	62 (55,8)*	111
<b>Grupo 7</b>	1,5 – 3,5	64 (62,7) <sup>a</sup>	102
<b>Grupo 8</b>	1,5 – 4	76 (69,7) <sup>ab</sup>	109
<b>Grupo 9</b>	2 – 4	87 (77,0) <sup>b</sup>	113

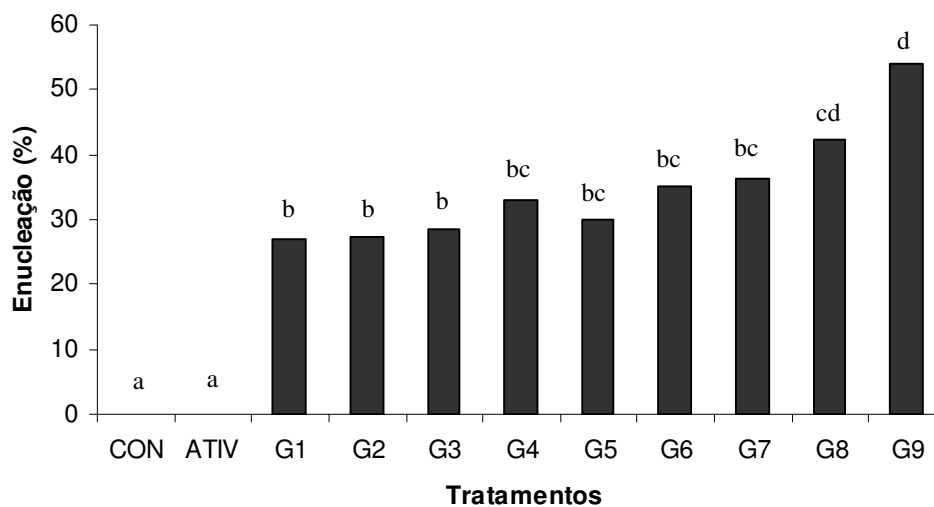
Asteriscos denotam diferença em relação ao grupo ATIVADO

<sup>a,b</sup> Valores com sobrescritos iguais entre linhas não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Com relação às taxas de enucleação (Figuras 7 e 8), todos os grupos tratados com demecolcina foram significativamente diferentes dos grupos CON (0/114) e ATIV (0/130). Considerando os grupos DEME, os grupos G8 (46/109 – 42,2%) e G9 (61/113 – 54,0%) apresentaram taxas superiores ( $p < 0,05$ ) a todos os outros grupos (26,8 a 36,3%), mas foram similares entre si. Como o grupo G9 (DEME 2 h – 4 h) apresentou maior valor numérico tanto em ativação quanto em enucleação, foi o grupo escolhido para os experimentos seguintes.



**Figura 7.** Fotomicrografias de oócitos bovinos ativados tratados com demecolcina, apresentando enucleação completa e submetidos à coloração com Bisbenzimidide (Hoechst 33342), observados com (A) ou sem fluorescência (B). Aumento 200X.



**Figura 8.** Representação gráfica da porcentagem de oócitos enucleados (EN) após ativação com  $5\mu\text{M}$  de ionomicina por 5 min e  $10\mu\text{g/mL}$  de cicloheximide por até 4 h e diferentes tratamentos com demecolcina (DEME): Grupo 1 (DEME 0 – 2 h); Grupo 2 (DEME 0 – 4 h); Grupo 3 (DEME 0,5 – 2,5 h); Grupo 4 (DEME 0,5 – 4 h); Grupo 5 (DEME 1 – 3 h); Grupo 6 (DEME 1 – 4 h); Grupo 7 (DEME 1,5 – 3,5 h); Grupo 8 (DEME 1,5 – 4 h); Grupo 9 (DEME 2 – 4 h). <sup>a,b,c,d</sup>Colunas com sobrescritos diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). CON – controle; ATIV – ativado.

### 5.1.3. Avaliação do tempo de incubação em demecolcina após 2 h da ativação para EN química total

Com o objetivo de confirmar protocolo indicado na literatura para a enucleação química total de oócitos bovinos (FISCHER RUSSEL et al., 2005), que preconiza o tratamento com demecolcina por 2 h após 2 h de ativação, amostras de oócitos ativados por 2 h foram avaliadas após 0,25 h; 0,5 h; 1,0 h; 1,5 h e 2,0 h de exposição à demecolcina.

Novamente, efeitos da demecolcina foram observados após 15 minutos de tratamento, sendo que o grupo DEME já apresentou diferença do grupo CON a partir do referido momento. Os dados da tabela 5 mostram que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com DEME por 1,0; 1,5 ou 2,0 h. Assim, conclui-se com base no presente experimento que após 2,0 h de ativação e 1,0 h de exposição à demecolcina, já se pode iniciar o procedimento de enucleação.

**Tabela 5.** Taxas de enucleação (EN) de oócitos bovinos ativados por 2,0 h e expostos em seguida à 0,05µg/mL de demecolcina por 0,25 h; 0,5 h; 1,0 h; 1,5 h e 2,0 h, em combinação ao agente de ativação ciclohexemide. CON – grupo controle; DEME – grupo tratado pela demecolcina.

Tempo	No. Oócitos EN (%)	No. Total
0 h	0 <sup>d</sup>	65
0,25 h CON	02 (3,6%) <sup>d</sup>	55
0,25 h DEME	13 (15,8%) <sup>b</sup>	82
0,5 h CON	03 (5,2%) <sup>c,d</sup>	58
0,5 h DEME	12 (13,9%) <sup>b,c</sup>	86
1,0 h CON	03 (5,3%) <sup>b,d</sup>	57
1,0 h DEME	34 (36,9%) <sup>a</sup>	92
1,5 h COM	04 (4,2%) <sup>d</sup>	95
1,5 h DEME	32 (35,2%) <sup>a</sup>	91
2,0 h CON	09 (9,9%) <sup>b,d</sup>	91
2,0 h DEME	43 (46,7%) <sup>a</sup>	92

<sup>a,b,c,d</sup> Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si (p<0,05).



## **5.2. Experimento II – Dinâmica nuclear e de microtúbulos em oócitos ativados partenogeneticamente submetidos à EN química total**

Saraiva (2006) avaliou os efeitos da demecolcina na organização de microtúbulos em oócitos tratados em MII, ou seja, sem passarem por processo de ativação, e resultados interessantes foram obtidos. Resumidamente, efeitos da demecolcina ocorreram em apenas 0,5 h de tratamento, com ausência completa de microtúbulos nas estruturas avaliadas. Ainda, houve nova polimerização dos microtúbulos, quando oócitos tratados foram cultivados em meio livre de demecolcina por mais 6 horas.

Diante dos resultados obtidos anteriormente, neste experimento realizou-se um estudo dos efeitos desse agente desestruturador de microtúbulos (MTs) em oócitos ativados, de forma que fosse compreendido o “status” dessas estruturas nos citoplastos obtidos pela técnica de enucleação química total.

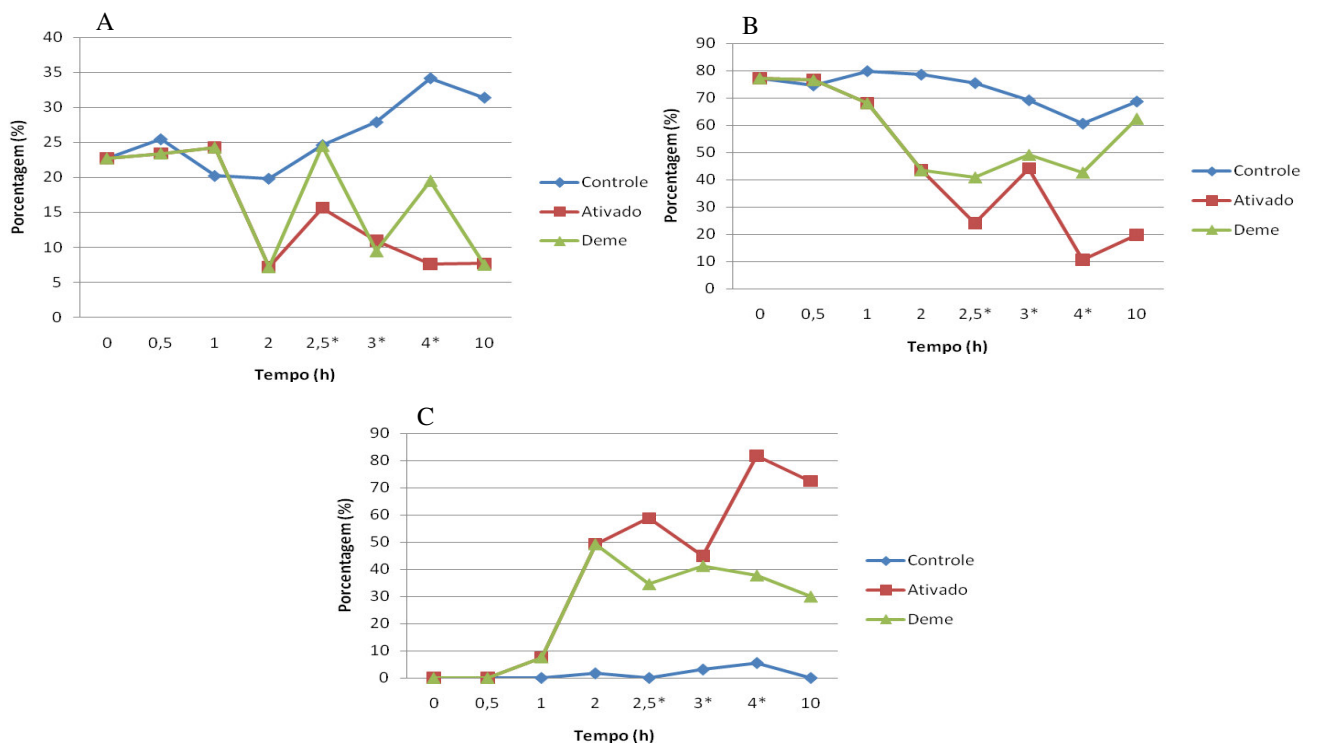
Para monitorar o efeito da demecolcina na progressão nuclear e organização de microtúbulos após o processo de ativação, oócitos bovinos expostos à ionomicina e ao cicloheximide, e tratados com demecolcina por até 2 h, foram avaliados 0 h (MII); 0,5 h; 1,0 h; 2,0 h; 2,5 h; 3,0 h; 4,0 h e 10 h após o início do processo de ativação.

Foram estabelecidos três grupos: Controle, onde oócitos foram cultivados na ausência de agentes ativadores e de demecolcina; Ativado, no qual oócitos foram expostos apenas aos agentes ativadores, ou seja, à ionomicina por 5 min e ao cicloheximide por até 4 h; e o grupo Deme, em que oócitos ativados foram expostos à demecolcina nas últimas 2 h de ativação.

Inicialmente, quanto à avaliação dos efeitos da demecolcina sobre o núcleo, os oócitos foram classificados em três categorias: imaturos (oócitos em MI), maduros (oócitos em AI/TI ou em MII) e ativados (oócitos em AII/TII, com extrusão do 2º CP ou com presença de PN).

Os três grupos estudados (Controle, Ativado e Deme) apresentaram comportamento semelhante em relação à presença de oócitos imaturos no decorrer da avaliação, sem que diferenças significativas fossem constatadas (Figura 9 e Tabela 6).

Quanto à avaliação de oócitos maduros, os grupos que foram expostos a agentes ativadores (Ativado e Deme) apresentaram redução dessa categoria após 10 h do início do tratamento, em decorrência do aumento significativo de oócitos que se apresentavam ativados (Figura 9 e Tabela 6). Ainda, efeitos da ativação já foram detectados a partir de 2 h, quando os grupos Ativado e Deme apresentaram média de oócitos ativados superior em relação ao grupo controle (Figura 9 e Tabela 6).



**Figura 9.** Representação gráfica da dinâmica nuclear em oócitos bovinos ativados expostos à demecolcina, avaliados em intervalos de 0,5 h e 1,0 h entre 0 h e 10 h após o início da ativação. Grupos avaliados: Controle (sem ativação e tratamento com demecolcina); Ativado (exposto apenas aos agentes ativadores) e Deme (ativado e submetido ao tratamento com demecolcina por 2 h), sendo representados em (A) oócitos imaturos, em (B) oócitos maduros e em (C) oócitos ativados. O sinal \* indica exposição à demecolcina.

**Tabela 6.** Porcentagem de diferentes estádios nucleares (oócitos imaturos, maduros ou ativados) em grupo tratado com demecolcina (Deme) por 2 h e nos grupos Controle e Ativado em intervalos de 0,5 h e 1,0 h entre 0 h (MII) e 10 h após o início da ativação. O sinal \* indica exposição à demecolcina.

Grupos	Categorias	Tempos (h)							
		0	0,5	1	2	2,5*	3*	4*	10
Controle	imaturos	22,69	25,46	20,24	19,84	24,63	27,89	34,13	31,38
	maturos	77,31 <sup>a</sup>	74,54 <sup>a</sup>	79,76 <sup>a</sup>	78,49 <sup>a</sup>	75,37 <sup>a</sup>	69,08 <sup>a</sup>	60,48 <sup>a</sup>	68,62 <sup>a</sup>
	ativados	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	1,67 <sup>cd</sup>	0 <sup>d</sup>	3,03 <sup>abcd</sup>	5,4 <sup>abcd</sup>	0 <sup>d</sup>
Ativado	imaturos	22,69	23,4	24,24	7,14	15,63	10,9	7,58	7,67
	maturos	77,31 <sup>a</sup>	76,6 <sup>a</sup>	68,18 <sup>a</sup>	43,57 <sup>ab</sup>	24,17 <sup>ab</sup>	44,23 <sup>ab</sup>	10,61 <sup>b</sup>	19,89 <sup>ab</sup>
	ativados	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	7,58 <sup>abcd</sup>	49,29 <sup>a</sup>	58,8 <sup>a</sup>	44,87 <sup>abcd</sup>	81,82 <sup>a</sup>	72,44 <sup>a</sup>
Deme	imaturos	22,69	23,4	24,24	7,14	24,47	9,43	19,49	7,5
	maturos	77,31 <sup>a</sup>	76,6 <sup>a</sup>	68,18 <sup>a</sup>	43,57 <sup>ab</sup>	40,97 <sup>ab</sup>	49,27 <sup>ab</sup>	42,76 <sup>ab</sup>	62,5 <sup>a</sup>
	ativados	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	7,58 <sup>abcd</sup>	49,29 <sup>a</sup>	34,56 <sup>abc</sup>	41,3 <sup>ab</sup>	37,76 <sup>ab</sup>	30 <sup>abc</sup>

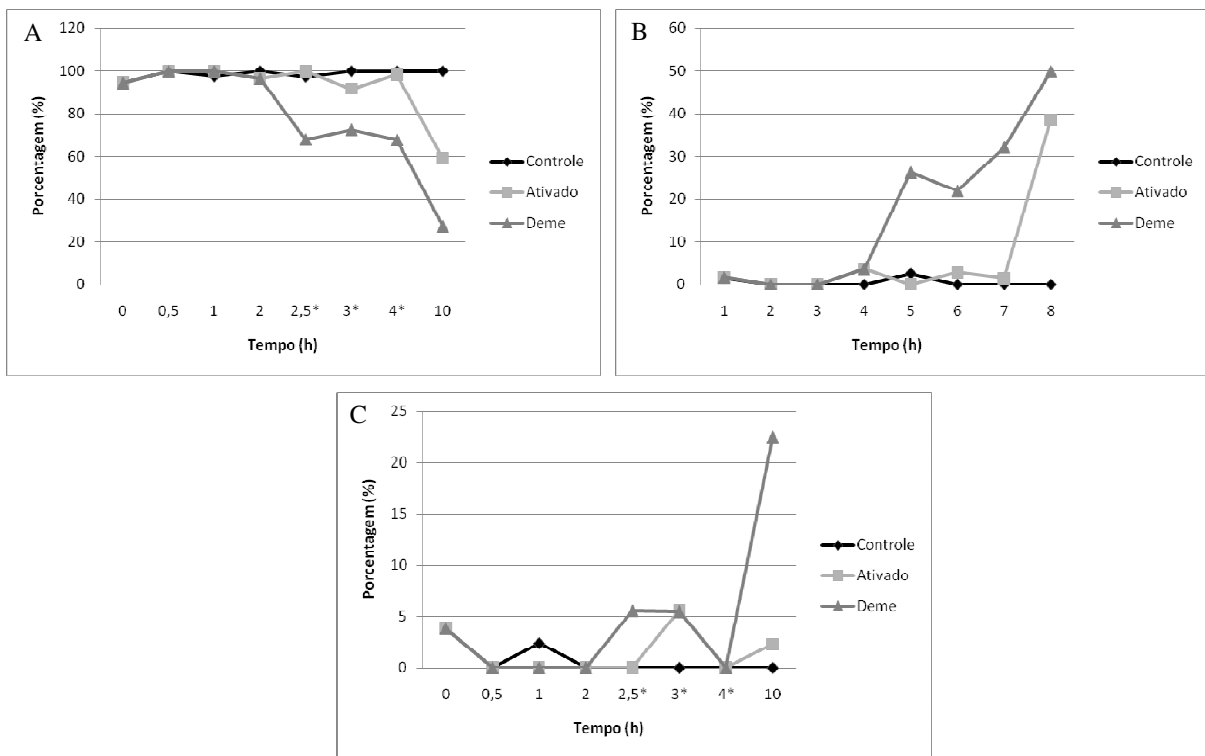
<sup>a,b,c,d</sup>Valores com sobrescritos diferentes dentro de uma linha ou entre linhas de uma mesma categoria diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

Em uma segunda etapa, procedeu-se a avaliação da configuração dos microtúbulos após exposição dos oócitos à demecolcina. Novamente, três categorias foram observadas: oócitos com microtúbulos presentes, ou seja, bastante evidentes; oócitos com microtúbulos reduzidos, ou seja, com diminuição da densidade dos mesmos, e oócitos com microtúbulos ausentes.

Observou-se diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) de oócitos com MTs presentes no grupo Deme em comparação ao grupo Ativado após 2,5 h do início da ativação (0,5 h de exposição à demecolcina) – 68% e 100%, respectivamente, sendo que na avaliação após 10 h, tanto o grupo Ativado quanto o grupo Deme apresentaram médias inferiores em relação ao grupo Controle, diferindo também entre si (Controle – 100%; Ativado – 59%, e Deme – 28%) (Figura 10 e Tabela 7)

Paralelamente, verificou-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de oócitos com MTs reduzidos no grupo Deme a partir de 2,5 h do início da ativação, que manteve média superior em comparação aos grupos Controle e Ativado até 4 h após o início do processo de ativação e tratamento (Figura 10 e Tabela 7).

Na avaliação após 10 h do início da ativação, ou seja, após 6 h de cultivo em meio livre de agentes ativadores e demecolcina, observou-se no grupo Deme que aproximadamente 50% dos oócitos apresentavam redução de MTs. Porém, não foi constatada diferença significativa em relação ao grupo Ativado nesse mesmo momento, apenas em relação ao grupo Controle. Ainda, na avaliação após 10 h, o grupo Deme apresentou média de 23% dos oócitos com ausência de MTs, que foi superior ( $p < 0,05$ ) em comparação aos grupos Controle e Ativado (Figura 10 e Tabela 7).



**Figura 10.** Representação gráfica da dinâmica de microtúbulos em oócitos bovinos ativados expostos à demecolcina, avaliados em intervalos de 0,5 h e 1,0 h entre 0 h e 10 h após o início da ativação. Grupos avaliados: Controle (sem ativação e tratamento com demecolcina); Ativado (exposto apenas aos agentes ativadores) e Deme (ativado e submetido ao tratamento com demecolcina por 2 h), sendo representados em (A) oócitos com MTs presentes, em (B) oócitos com MTs reduzidos e em (C) oócitos com MTs ausentes. O sinal \* indica exposição à demecolcina.

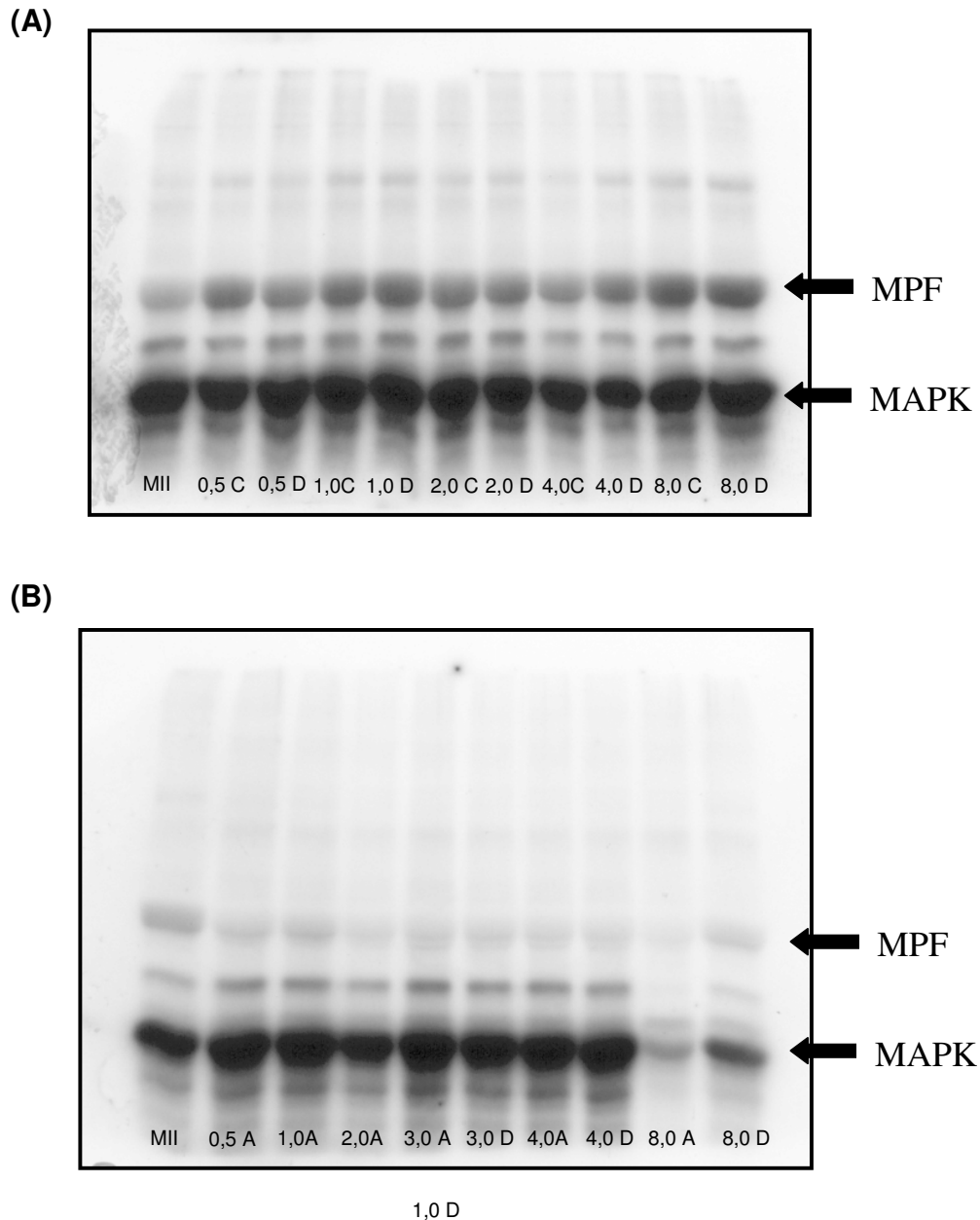
**Tabela 7.** Porcentagem de diferentes configurações de microtúbulos (presentes, reduzidos ou ausentes) em grupo tratado com demecolcina (grupo Deme) e nos grupos Controle e Ativado em intervalos de 0,5 h e 1,0 h entre 0 h (MII) e 10 h após o início da ativação. O sinal \* indica exposição à demecolcina.

Grupos	Categorias	Tempos (h)							
		0	0,5	1	2	2,5*	3*	4*	10
Controle	presentes	94 <sup>abc</sup>	100 <sup>a</sup>	98 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	97 <sup>abc</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
	reduzidos	2 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	ausentes	4 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
Ativado	presentes	94 <sup>abc</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	96 <sup>abc</sup>	100 <sup>a</sup>	92 <sup>abc</sup>	98 <sup>ab</sup>	59 <sup>d</sup>
	reduzidos	2 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	39 <sup>a</sup>
	ausentes	4 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>
Deme	presentes	94 <sup>abc</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	96 <sup>abc</sup>	68 <sup>cd</sup>	73 <sup>abcd</sup>	68 <sup>abcd</sup>	28 <sup>e</sup>
	reduzidos	2 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	26 <sup>a</sup>	22 <sup>a</sup>	32 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>
	ausentes	4 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	23 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c,d</sup>Valores com sobrescritos diferentes dentro de uma linha ou entre linhas de uma mesma categoria diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

### 5.3. Experimento III – Avaliação de atividade do Fator Promotor de Maturação (MPF) e da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) em oócitos utilizados na EN química parcial e na EN química total

A atividade da histona (H1) e da MBP em oócitos tratados com demecolcina, com a finalidade de uso na técnica de EN química parcial (A) ou na técnica de EN química total (B) está representada na Figura 11.



**Figura 11.** Representação do ensaio da histona H1 (peso molecular de 35 KDa), marcando a atividade de MPF, e da proteína MBP (peso molecular de 20,4 KDa), marcando a atividade da MAPK, em gel de poliacrilamida a 15%. (A) Gel obtido de amostras destinadas à técnica de EN parcial (oócitos em MII expostos à demecolcina) e (B) Gel obtido de amostras destinadas à técnica de EN total (oócitos ativados expostos à demecolcina). C – controle, A – ativado, D – demecolcina.

Na técnica A, oócitos foram obtidos em MII (19 h MIV), após 0,5 h, 1,0 h e 2,0 h de tratamento com demecolcina e após 4,0 h e 8,0 h do início da exposição à droga, lembrando que o tratamento foi aplicado apenas nas primeiras 2 h e após esse período, os oócitos foram submetidos a meio livre de demecolcina. Em todos os momentos citados, foram avaliados também oócitos do grupo controle, ou seja, que não foram expostos à demecolcina.

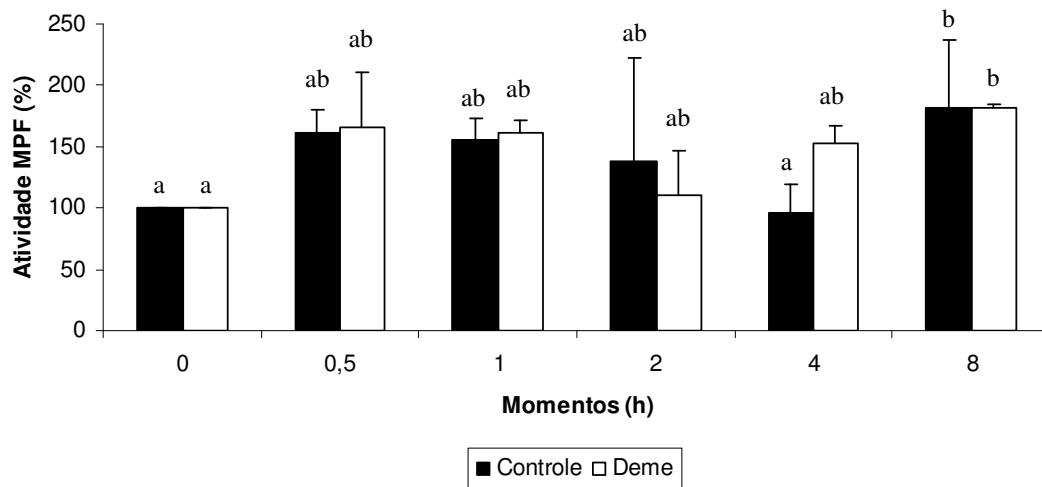
Quanto à atividade do MPF avaliada na técnica A, observou-se que as médias foram similares ( $p>0,05$ ) entre o grupo controle e o grupo tratado no decorrer da avaliação, sendo que o grupo MII foi arbitrariamente considerado com 100% de atividade (Tabela 8 e Figura 12). A atividade do MPF foi relativamente constante nas primeiras duas horas de avaliação. Após 4,0 h, a média do grupo tratado foi aproximadamente 60% superior numericamente à média do grupo controle (aumento não significativo), e ao final da avaliação (8,0 h após o início do tratamento), os dois grupos apresentaram médias similares entre si ( $p>0,05$ ), porém, superiores ( $p<0,05$ ) à média inicial (0 h).

Não foi observada interação entre os grupos e os momentos, sendo constatadas diferenças significativas apenas entre os momentos (0 h e 8 h).

**Tabela 8.** Porcentagem de atividade média do Fator Promotor de Maturação (MPF) ao longo do período de tratamento com a demecolcina na técnica de EN parcial (grupo tratado).

<b>Grupos</b>	<b>MI I</b>	<b>0,5 h</b>	<b>1,0 h</b>	<b>2,0 h</b>	<b>4,0 h</b>	<b>8,0 h</b>
<b>Controle</b>	100,0 <sup>a</sup>	161,1 <sup>ab</sup>	156,2 <sup>ab</sup>	138,0 <sup>ab</sup>	96,3 <sup>a</sup>	181,8 <sup>b</sup>
<b>Tratado</b>	100,0 <sup>a</sup>	165,4 <sup>ab</sup>	161,1 <sup>ab</sup>	110,4 <sup>ab</sup>	152,9 <sup>ab</sup>	181,4 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Valores com sobrescritos diferentes entre linhas e entre colunas diferem entre si ( $p<0,05$ ).



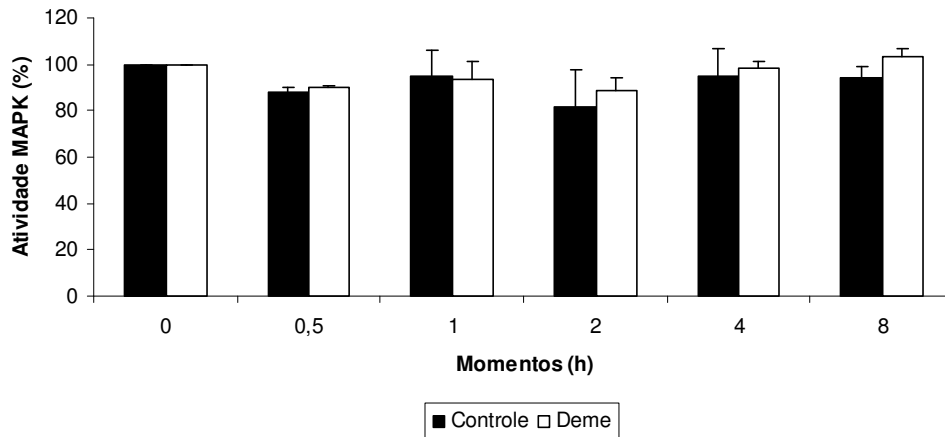
**Figura 12.** Representação gráfica do comportamento do Fator Promotor de Maturação (MPF) ao longo do período de tratamento com a demecolcina na técnica de EN parcial (A). Deme – tratado com demecolcina. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

Quanto à atividade da MAPK na técnica A, não foi verificada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos controle e tratado no decorrer do tempo, com médias variando entre 81,8 e 103,5% (Tabela 9 e Figura 13). Também não foram constatadas diferenças estatísticas entre os momentos, e não houve interação entre os grupos e os momentos avaliados.

**Tabela 9.** Porcentagem de atividade média da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) ao longo do período de tratamento com a demecolcina na técnica de EN parcial (grupo tratado).

Grupos	MII	0,5 h	1,0 h	2,0 h	4,0 h	8,0 h
Controle	100,0	88,0	94,6	81,8	94,8	94,2
Tratado	100,0	90,2	93,2	88,8	98,4	103,5





**Figura 13.** Representação gráfica do comportamento da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) ao longo do período de tratamento com a demecolcina na técnica de EN parcial (A). Deme – tratado com demecolcina.

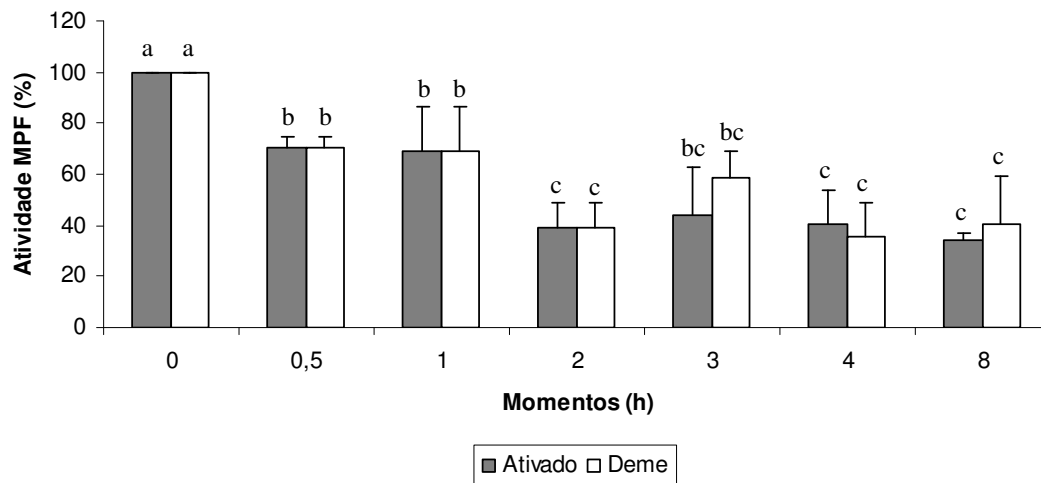
Na técnica B, foram avaliados oócitos após 26 h MIV (MII); 0,5 h; 1,0 h; 2,0 h; 3,0 h; 4,0 h, e 8,0 h do início da ativação (que durou 4 h), sendo que a exposição à demecolcina ocorreu apenas nas últimas duas horas de ativação. Como grupo controle, foram avaliados oócitos expostos apenas à ativação (sem tratamento com a demecolcina) em cada momento avaliado.

Quanto à atividade do MPF, verificou-se na técnica B diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da porcentagem média de atividade desse fator após 0,5 h de ativação (Tabela 10 e Figura 14), sendo observada nova diminuição ( $p < 0,05$ ) após 2,0 h. A partir desse momento, constatou-se similaridade entre as médias até o final da avaliação. Em nenhum dos momentos avaliados, foi verificada diferença significativa entre os grupos controle e tratado.

**Tabela 10.** Porcentagem de atividade média do MPF ao longo do período de ativação e tratamento com a demecolcina (DEME) na técnica de EN total.

Grupos	0 h	0,5 h	1,0 h	2,0 h	3,0 h	4,0 h	8,0 h
<b>Ativado</b>	100 <sup>a</sup>	70,3 <sup>b</sup>	69,3 <sup>b</sup>	39,1 <sup>c</sup>	44,0 <sup>bc</sup>	40,8 <sup>c</sup>	34,3 <sup>c</sup>
<b>DEME</b>	100 <sup>a</sup>	70,3 <sup>b</sup>	69,3 <sup>b</sup>	39,1 <sup>c</sup>	58,7 <sup>bc</sup>	35,8 <sup>c</sup>	40,2 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Valores com sobrescritos diferentes entre colunas diferem entre si ( $p < 0,05$ ).



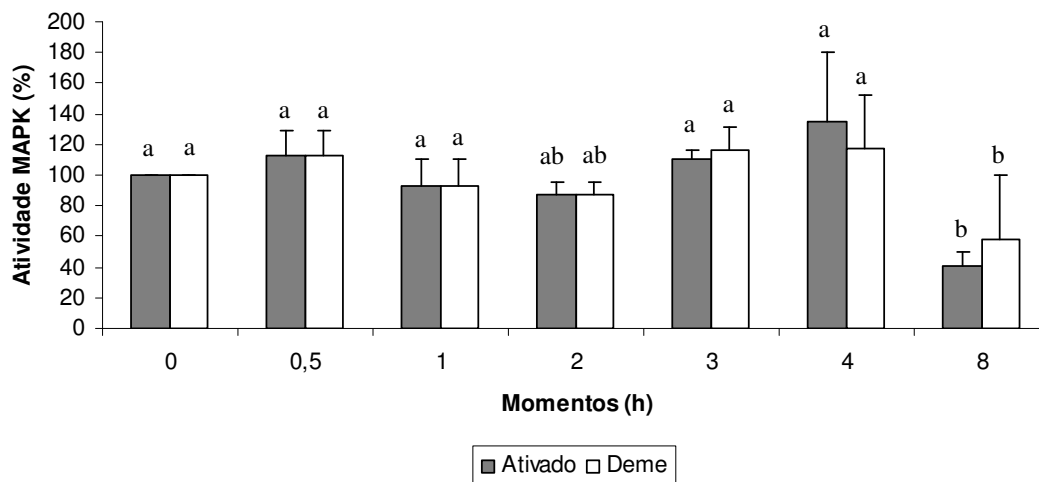
**Figura 14.** Representação gráfica do comportamento do Fator Promotor de Maturação (MPF) ao longo do período de ativação e tratamento com a demecolcina na técnica de EN total (B). Ativado – grupo controle ativado; Deme – exposto à demecolcina entre 2 e 4 h de ativação. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

Com relação à atividade da MAPK na técnica B, também foram observadas médias similares ( $p > 0,05$ ) entre os grupos ativado e tratado (deme) durante as primeiras 4,0 h de avaliação, ocorrendo diminuição significativa das médias apenas após 8,0 h do início do processo, quando novamente não foram verificadas alterações estatísticas entre os dois grupos, apesar do aumento numérico de aproximadamente 18% da média do grupo tratado em relação ao grupo ativado (Tabela 11 e Figura 15).

**Tabela 11.** Porcentagem de atividade média da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) ao longo do período de ativação e tratamento com a demecolcina (DEME) na técnica de EN total.

	0 h	0,5 h	1,0 h	2,0 h	3,0 h	4,0 h	8,0 h
<b>Ativado</b>	100 <sup>a</sup>	112,3 <sup>a</sup>	93,4 <sup>a</sup>	86,9 <sup>ab</sup>	110,7 <sup>a</sup>	134,5 <sup>a</sup>	40,2 <sup>b</sup>
<b>DEME</b>	100 <sup>a</sup>	112,3 <sup>a</sup>	93,4 <sup>a</sup>	86,9 <sup>ab</sup>	116,2 <sup>a</sup>	117,7 <sup>a</sup>	58,0 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Valores com sobrescritos diferentes entre colunas diferem entre si ( $p < 0,05$ ).



**Figura 15.** Representação gráfica do comportamento da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) ao longo do período de ativação e tratamento com a demecolcina na técnica de EN total (B). (A) – controle ativado; (D) – exposto à demecolcina entre 2 e 4 h de ativação. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4. Experimento IV – Avaliação da eficiência de diferentes técnicas de enucleação oocitária, desenvolvimento inicial e expressão gênica em embriões reconstituídos por TN a partir de citoplastos oriundos de EN química

##### 5.4.1. Avaliação da eficiência de diferentes técnicas de enucleação: Convencional, EN química parcial e EN química total

Para verificação da eficiência do processo de enucleação, foram avaliados 211 oócitos na técnica convencional, 236 oócitos na técnica de EN química parcial e 169 oócitos na técnica de EN química total.

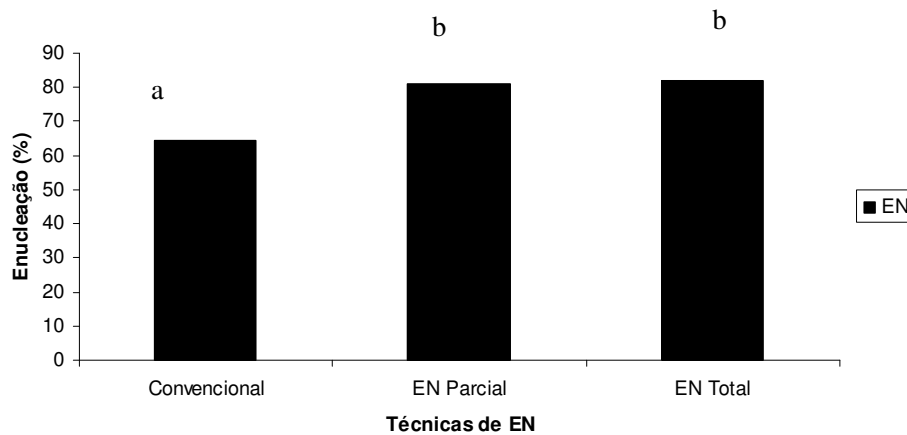
Como não foi realizado o processo de separação de oócitos com presença do 1º CP anteriormente à micromanipulação, parte dos oócitos avaliados inicialmente não pôde ser aproveitada nos procedimentos, pelo fato dos mesmos não apresentarem adequada maturação (MII) ou apresentarem algum tipo de degeneração. Assim, foram submetidos, de fato, 95, 105 e 110 oócitos às técnicas de enucleação convencional, parcial e total, respectivamente.

Após a realização dos tratamentos e dos procedimentos de micromanipulação, verificou-se que as técnicas de EN química parcial (85/105 – 80,9%) e EN química total (90/110 – 81,8%) apresentaram maior eficiência ( $p < 0,05$ ) que a técnica convencional (61/95 – 64,2%), de acordo com a Tabela 12 e a Figura 16, e não apresentaram diferença entre si ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 12.** Eficiência do processo de enucleação (EN) em oócitos bovinos submetidos à técnica convencional (EN CONV) e às técnicas de enucleação química parcial (EN PARCIAL) e total (EN TOTAL).

Técnicas de EN	EN (%)	Total
EN CONV	61 (64,2%) <sup>a</sup>	95
EN PARCIAL	85 (80,9%) <sup>b</sup>	105
EN TOTAL	90 (81,8%) <sup>b</sup>	110

<sup>a,b</sup> Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ( $p < 0,05$ ).



**Figura 16.** Representação gráfica da eficácia da enucleação (EN) após realização da técnica convencional e das técnicas com exposição à demecolcina (EN Parcial e EN Total). Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

Dessa forma, o presente estudo mostra que as técnicas de enucleação auxiliadas quimicamente pela demecolcina permitem adequadas taxas de enucleação, evitando a necessidade de utilização de irradiação UV e retirada de grande parte do citoplasma, como normalmente é feito em procedimentos de enucleação convencionais, além de apresentarem maiores eficácias.

#### 5.4.2. Produção de embriões

Para padronização da produção de embriões pelas diferentes técnicas foram realizadas inúmeras sessões de micromanipulação, além de diversas rotinas de fecundação *in vitro* e ativação partenogénica. Os resultados das taxas de fusão e desenvolvimento de embriões micromanipulados pelas diferentes técnicas de enucleação e reconstituídos a partir de células doadoras embrionárias estão descritos abaixo, nas Tabelas 13 e 14.

**Tabela 13.** Quantidade de estruturas reconstituídas, e taxas (%) de fusão e lise em oócitos bovinos submetidos ao procedimento de transferência nuclear após realização das técnicas de enucleação convencional, parcial e total.

	<i>Reconstituição</i>	<i>Fusão</i>	<i>Lise</i>
<b>EN convencional</b>	165	89 ( <b>53,9%</b> )	19 (11,5%)
<b>EN parcial</b>	187	113 ( <b>60,4%</b> )	15 (8,0%)
<b>EN total</b>	88	58 ( <b>65,9%</b> )	07 (7,9%)

Após a realização do procedimento de reconstituição, foram verificadas maiores taxas de fusão nos grupos que envolveram enucleação química (EN parcial e EN total), a despeito da similaridade ( $p>0,05$ ) entre as médias (Tabela 13).

Quanto às taxas de clivagem e produção de blastocistos, não foram observadas diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre os grupos reconstituídos a partir das diferentes técnicas de EN, sendo que também não foram verificadas diferenças entre os sexos. Devido ao pequeno número amostral de estruturas advindas dos grupos reconstituídos por TN, a estatística apresentada pode não refletir a real produção embrionária a partir das diferentes técnicas e assim, maiores conclusões quanto às taxas de produção não podem ser realizadas a partir deste estudo.

**Tabela 14.** Número e porcentagem de estruturas clivadas e de blastocistos dos sexos feminino (F) e masculino (M) produzidos por TN a partir de células doadoras embrionárias, após realização das técnicas de enucleação convencional (EN Conv), parcial (EN Parcial) e total (EN Total) em bovinos.

	<i>Clivagem n (%)</i>	<i>Blastocistos n (%)</i>
<b>EN Conv F</b>	16/24 (66,7%)	07/24 (29,2%)
<b>EN Conv M</b>	26/42 (61,9%)	09/42 (21,4%)
<b>EN Parcial F</b>	17/24 (70,8%)	06/24 (25,0%)
<b>EN Parcial M</b>	33/44 (75,0%)	08/44 (18,2%)
<b>EN Total F</b>	27/43 (62,8%)	06/43 (13,9%)
<b>EN Total M</b>	36/47 (76,6%)	08/47 (17,0%)

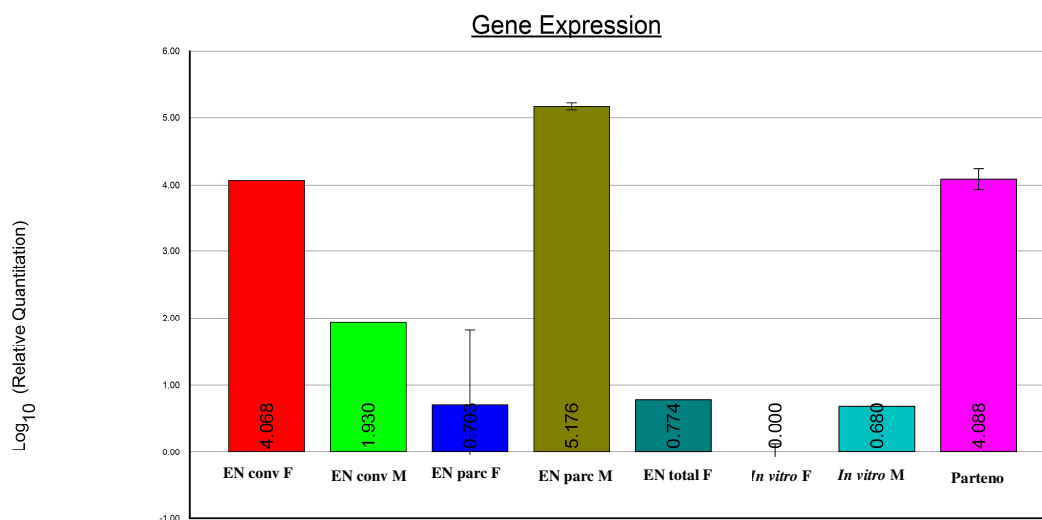
#### **5.4.3. Avaliação da expressão dos genes *XIST*, *G6PD* e *HSPA1* em blastocistos bovinos dos sexos feminino e masculino produzidos a partir de células doadoras embrionárias e citoplastos obtidos pelas técnicas de EN convencional, química parcial e química total**

Os valores médios dos ciclos do “threshold” (Ct) para o *GAPDH* nos grupos foram  $25,21 \pm 0,39$  para o grupo *in vitro* F;  $25,40 \pm 0,08$  para o grupo *in vitro* M;  $32,78 \pm 2,61$  para o grupo *in vivo* F;  $31,98 \pm 0,29$  para o grupo *in vivo* M;  $27,75 \pm 0,44$  para o grupo parteno;  $36,40 \pm 1,29$  para o grupo EN conv F;  $37,37 \pm 0,84$  para o grupo EN conv M;  $34,79 \pm 1,46$  para o grupo EN parc F;  $29,82 \pm 0,08$  para o grupo EN parc M;  $35,96 \pm 2,23$  para o grupo EN total F e  $35,98 \pm 1,31$  para o grupo EN total M.

Transcritos dos genes *GAPDH*, *XIST*, *G6PD* e *HSPA1* foram detectados em blastocistos com sete dias de desenvolvimento de ambos os sexos, produzidos *in vivo* (*In vivo* fêmea – grupo *In vivo* F e *In vivo* macho – grupo *In vivo* M) e *in vitro*, que por sua vez, foram obtidos a partir de fecundação *in vitro* (*In vitro* fêmea – grupo *In vitro* F, *In vitro* macho – grupo *In vitro* M), ativação partenogênética (grupo Parteno) e por transferência nuclear (3 técnicas de enucleação: Enucleação convencional, química parcial e química total – grupos EN conv F e M, EN parc F e M, EN total F e M, respectivamente). A expressão relativa desses genes foi individualmente avaliada em triplicata, a partir de 5 a 10 embriões por grupo.

Verificou-se expressão do gene *XIST* em alguns embriões supostamente do sexo masculino, mais precisamente 2 embriões produzidos por fecundação *in vitro*, 1 embrião produzido pela técnica convencional de TN e 2 embriões obtidos a partir da técnica de EN parcial. Por outro lado, não foram constatados transcritos desse gene em embriões do sexo masculino produzidos *in vivo* e obtidos a partir da técnica de EN total na TN (Figura 17).

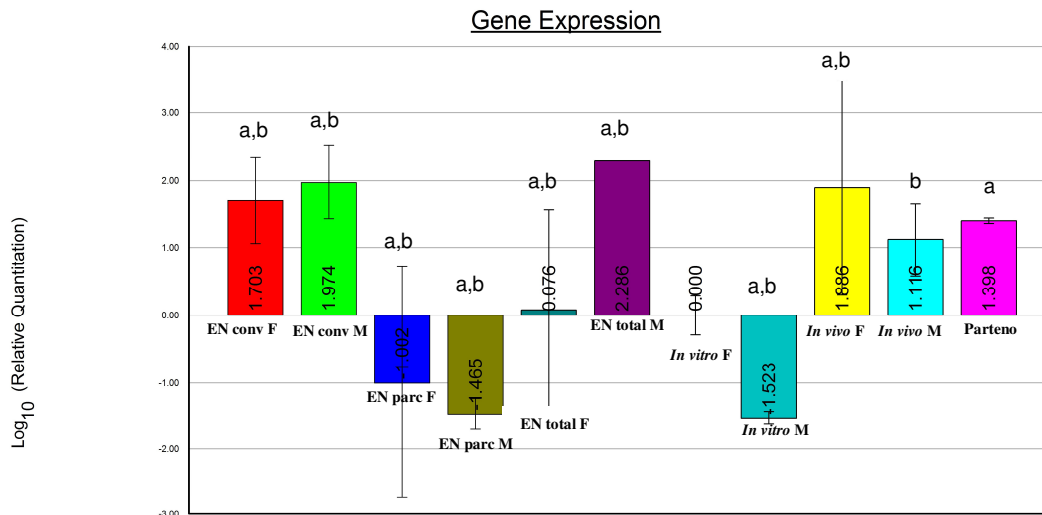
Não foram observadas diferenças proporcionais na expressão do *XIST* entre os diferentes grupos onde foi possível a detecção de transcritos (Figura 17).



**Figura 17.** Razão de expressão para o gene *XIST* em blastocistos bovinos dos sexos feminino (F) e masculino (M) obtidos por TN a partir de células doadoras embrionárias, após realização das técnicas de enucleação convencional (EN conv), parcial (EN parc) ou total (EN total), e em embriões produzidos *in vitro*, *in vivo* e por ativação partenogenética (Parteno). Grupo de referência = *In vitro* F.

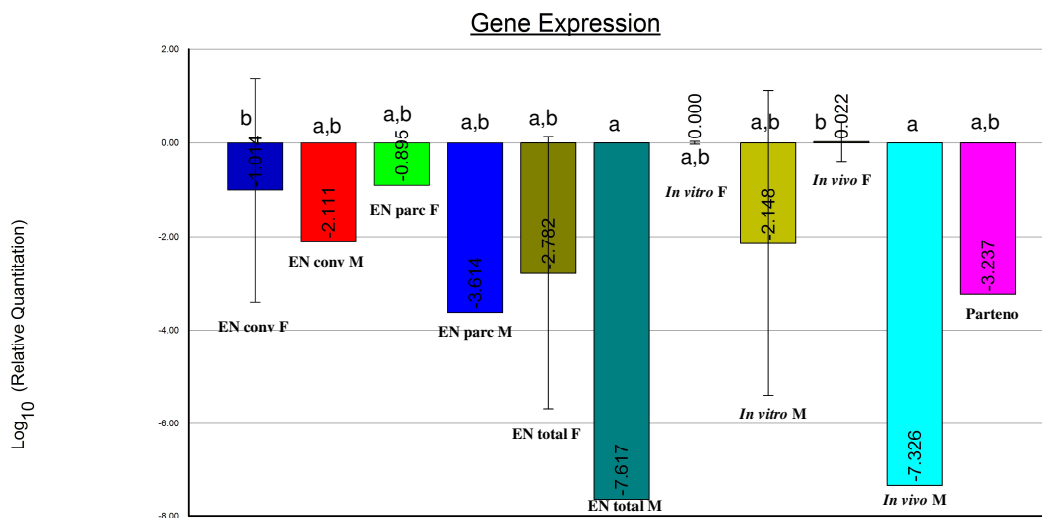


Quanto à expressão do gene *G6PD*, foram encontrados transcritos em embriões dos dois sexos em todos os grupos avaliados, e a única diferença significativa foi entre o grupo Parteno e o grupo *In vitro* M, sendo que o último grupo apresentou menores níveis de expressão ( $p < 0,05$ ) que o primeiro (Figura 18).



**Figura 18.** Razão de expressão para o gene *G6PD* em blastocistos bovinos dos sexos feminino (F) e masculino (M) obtidos por TN a partir de células doadoras embrionárias, após realização das técnicas de enucleação convencional (EN conv), parcial (EN parc) ou total (EN total) e reconstituídos com células embrionárias, e em embriões produzidos *in vitro*, *in vivo* e por ativação partenogenética (Parteno). Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Grupo de referência = *In vitro* F.

Analisando a expressão do gene *HSPA1*, foram constatadas diferenças significativas entre o grupo *In vivo* F e os grupos *In vivo* M e EN total M, que apresentaram menores ( $p < 0,05$ ) níveis de expressão do *HSPA1A*. Ainda, o grupo EN conv F apresentou níveis superiores ( $p < 0,05$ ) de expressão em relação aos grupos *In vivo* M e EN total M (Figura 19).



**Figura 19.** Razão de expressão para o gene *HSPA1A* em blastocistos bovinos dos sexos feminino (F) e masculino (M) obtidos por TN a partir de células doadoras embrionárias, após realização das técnicas de enucleação convencional (EN conv), parcial (EN parc) ou total (EN total) e reconstituídos com células embrionárias, e em embriões produzidos *in vitro*, *in vivo* e por ativação partenogenética (Parteno). Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Grupo de referência = *In vitro* F.

Assim, analisando conjuntamente as razões de expressão para os genes *XIST*, *G6PD* e *HSP* em embriões bovinos no estágio de blastocisto, constatou-se que não houve influência do sexo quando foram analisados embriões oriundos de fecundação *in vitro* e das diferentes técnicas de reconstituição a partir de células doadoras embrionárias. Porém, quando foram comparados embriões obtidos *in vivo*, constatou-se menores níveis de expressão do gene *HSPA1* em embriões do sexo masculino em relação àqueles do sexo feminino, refletindo talvez uma condição fisiológica.

#### 5.4.4. Avaliação da expressão dos genes *XIST*, *G6PD* e *HSPA1* em blastocistos bovinos do sexo feminino produzidos por transferência nuclear a partir de células doadoras adultas e citoplastos obtidos pelas técnicas de enucleação convencional e assistida quimicamente

Neste experimento, foram avaliados os níveis de expressão dos genes *XIST*, *G6PD* e *HSPA1A* em embriões produzidos por TN, reconstituídos com células somáticas (fibroblastos) de fêmeas bovinas, oriundos de enucleação convencional e parcial (assistida quimicamente pela demecolcina). Os referidos embriões foram obtidos em estudo anterior (SARAIVA et al., 2009) e mantidos em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização deste experimento. Os dados de produção embrionária obtidos por esses autores estão descritos na Tabela 15.

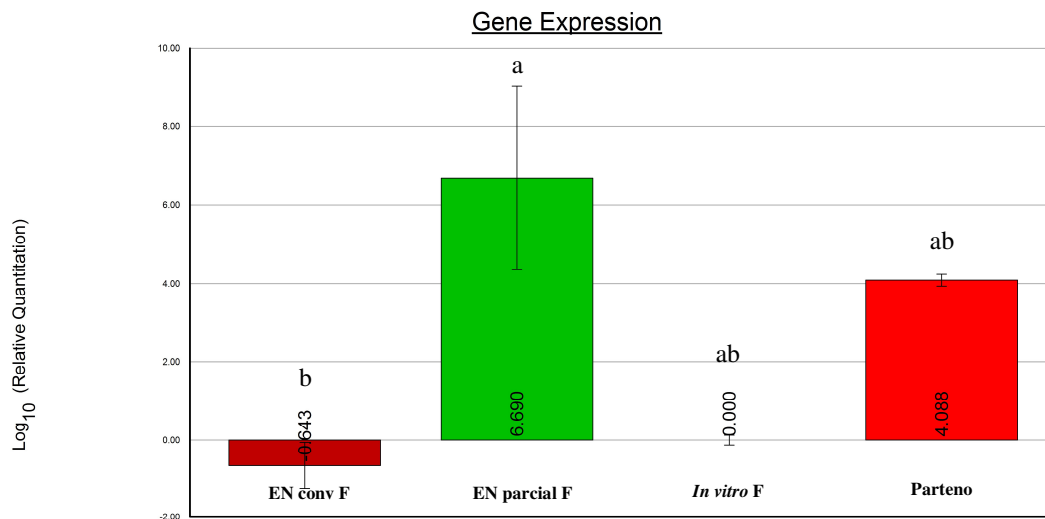
**Tabela 15.** Avaliação da taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto em embriões bovinos reconstituídos com células somáticas por TN após procedimentos de enucleação convencional e enucleação química parcial (SARAIVA et al., 2009).

Tratamento	n	Clivagem n (%)	Blastocistos n (%)
Convencional	78	55 (70,5%)	16 (20,5%)
EN Parcial	58	49 (84,5%)	16 (27,6%)

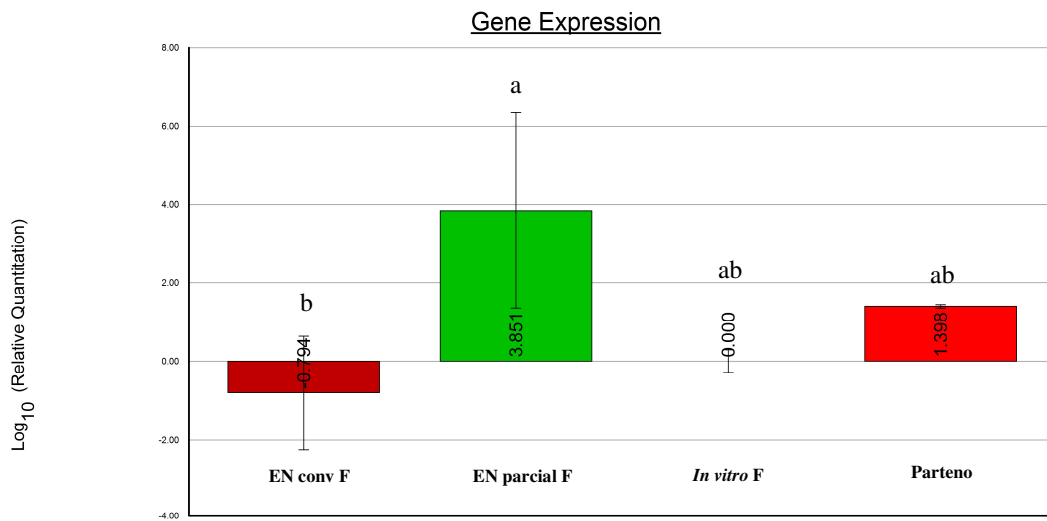
As razões de expressão gênica dos embriões reconstituídos por TN foram comparadas àquelas obtidas em embriões produzidos por fecundação *in vitro* e por ativação partenogenética.

Os valores médios dos ciclos do “threshold” (Ct) para o *GAPDH* nos grupos foram  $25,21 \pm 0,39$  para o grupo *in vitro* F;  $27,75 \pm 0,44$  para o grupo parteno;  $27,36 \pm 4,34$  para o grupo reconstituído a partir de células somáticas com técnica de enucleação convencional (EN conv) e  $35 \pm 8,06$  para o grupo reconstituído a partir de células somáticas com auxílio da técnica de enucleação química parcial (EN parcial).

Dados interessantes foram obtidos na comparação da expressão dos genes *XIST* e *G6PD* entre embriões do sexo feminino enucleados por diferentes técnicas e reconstituídos a partir de células somáticas (Figuras 20 e 21). Enquanto não foram observadas diferenças significativas entre os grupos *in vitro* F e Parteno em relação aos grupos reconstituídos, constatou-se maior expressão ( $p < 0,05$ ) tanto do *XIST* quanto do *G6PD* no grupo exposto à demecolcina (EN parcial F) quando comparado ao grupo reconstituído pela técnica convencional (EN conv F).

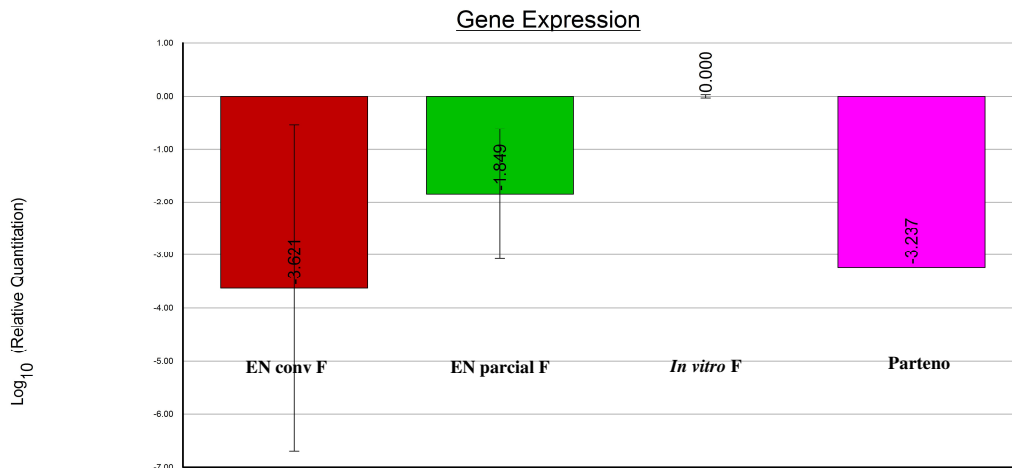


**Figura 20.** Expressão relativa de transcritos do gene *XIST* em blastocistos bovinos produzidos por fecundação *in vitro* (*In vitro*), ativação partenogenética (Parteno) e por TN a partir de células doadoras somáticas, após enucleação convencional (EN conv) ou química parcial (EN parcial). Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Grupo referência = *In vitro* F.



**Figura 21.** Expressão relativa de transcritos do gene *G6PD* em blastocistos bovinos produzidos por fecundação *in vitro*, ativação partenogenética e por TN a partir de células doadoras somáticas, após enucleação convencional (EN conv) ou química parcial (EN parcial). Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Grupo referência = *In vitro* F.

Quanto à avaliação da expressão do gene *HSPA1*, foi observada similaridade ( $p > 0,05$ ) das médias entre os grupos estudados (Figura 22).



**Figura 22.** Expressão relativa de transcritos do gene *HSPA1A* em blastocistos bovinos produzidos por fecundação *in vitro*, ativação partenogenética e por TN a partir de células doadoras somáticas, após enucleação convencional (EN conv) ou química parcial (EN parcial). Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Grupo referência = *In vitro* F.

## 6. DISCUSSÃO

### **Padronização das condições de cultivo em demecolcina de oócitos bovinos submetidos à EN química parcial e à EN química total**

Em um primeiro momento, realizou-se neste estudo, a padronização das melhores condições de cultivo com demecolcina em oócitos bovinos em MII, objetivando-se a obtenção de um protocolo eficiente para a enucleação assistida quimicamente.

A maior parte dos trabalhos relata a utilização de concentração de demecolcina igual ou superior a 0,4µg/mL por 2 horas, tanto para formação de protrusão na região cortical (YIN et al., 2002b; KAWAKAMI et al., 2003; VAJTA et al., 2004) quanto para a extrusão de toda a cromatina junto ao 2<sup>o</sup>CP, após ativação partenogenética (BAGUISI e OVERSTRÖM, 2000; IBÁÑEZ et al., 2002, 2003; YIN et al., 2002a, GASPARRINI et al., 2003; FISCHER RUSSEL et al., 2005).

Durante o mestrado (SARAIVA, 2006), foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações de demecolcina sobre a taxa de formação de protrusão na superfície cortical do oócito e verificou-se que a concentração de 0,05µg/mL foi superior às concentrações de 0,025 e 0,4µg/mL e semelhante à concentração 0,2µg/mL. Assim, ficou estabelecida a concentração 0,05µg/mL como sendo ideal para o uso da demecolcina em experimentos de enucleação química, em função de ter sido a menor concentração que proporcionou a maior eficácia na produção de oócitos com protrusões (55,1 ± 13,0%). Assim, este experimento visou complementar as informações já obtidas, de forma que fosse estabelecido um protocolo para enucleação assistida quimicamente com a menor concentração efetiva e o tempo mínimo necessário para que houvesse a formação de protrusão.

Efeitos da demecolcina foram verificados a partir de 15 minutos de tratamento, porém, os maiores valores foram obtidos a partir de 1 hora. Assim, constatou-se neste estudo, que o tratamento com demecolcina já pode ser interrompido a partir de 1 h,

otimizando-se, dessa maneira, o protocolo descrito anteriormente, já que o momento da enucleação pôde ser antecipado.

Em um segundo momento, foi avaliada a eficiência da técnica de enucleação química total. Observou-se em experimento prévio, que o cicloheximide se apresentou mais apropriado ao procedimento de enucleação química, pelo fato de possibilitar a extrusão do 2<sup>o</sup>CP durante o processo de ativação (cicloheximide – 66,6% de extrusão do 2<sup>o</sup>CP e 6-DMAP – 14,6%). Conforme já descrito na literatura (VERLHAC et al., 1994; LOI et al., 1998; MEO et al., 2007) o tratamento com 6-DMAP inibe a extrusão do 2<sup>o</sup>CP, devido à desestruturação que provoca no fuso meiótico, provavelmente, por meio da inibição sobre a MAPK, que é responsável pela organização do fuso. Assim, em todos os experimentos seguintes que envolveram ativação, os oócitos foram expostos inicialmente à ionomicina, e em seguida, ao cicloheximide, que é um inibidor de síntese protéica.

Avaliou-se também neste estudo, o efeito da demecolcina na retomada meiótica em oócitos bovinos, após o desencadeamento da ativação. Inicialmente, os oócitos foram expostos à demecolcina logo no começo do processo de ativação. Entretanto, baixas taxas de enucleação foram observadas (39,45 e 42,38% após 4 e 5 h de tratamento, respectivamente). Os dados sugerem que a demecolcina interferiu negativamente no processo de ativação, um segundo experimento foi realizado, sendo que o tratamento com a droga foi adicionado após diferentes momentos do início da ativação.

Constatou-se, de fato, ação prejudicial da demecolcina, quando a mesma foi adicionada ao meio de ativação no início do processo, sendo que esse efeito não foi mais observado após 1,5 h do desencadeamento da ativação, quando a taxa média de enucleação foi de 54,0%. Resultados semelhantes foram obtidos por Ibáñez et al. (2003) e Fischer Russel et al. (2005), que também avaliaram em oócitos murinos e de bovinos, respectivamente, diferentes momentos de exposição à demecolcina após o processo de ativação.

Ibáñez et al. (2003) observaram que a demecolcina prejudicou a rotação do fuso em oócitos murinos ativados, evento que normalmente antecede a formação do CP.

Assim, a interferência da demecolcina no processo de ativação, quando adicionada no início do processo, pode ser explicada por sua ação inibidora sobre a rotação do fuso meiótico. De acordo com esses autores, o início do tratamento com demecolcina em relação à ativação é o ponto chave para a obtenção de sucesso no processo de enucleação.

A organização e desorganização do citoesqueleto, em particular de microtúbulos e microfilamentos, têm papel fundamental na formação do fuso meiótico, no alinhamento e na segregação dos cromossomos, na movimentação do material nuclear de uma posição central para a região cortical e na extrusão do 1° e 2°CP (LI et al., 2005). Os microtúbulos, juntamente com microfilamentos e uma série de proteínas associadas, estão envolvidos no processo de citocinese, estimulando a formação de um anel contrátil durante a anáfase, necessário à completa separação das células filhas (LARKIN e DANILCHIK, 1999).

Oócitos bovinos geralmente requerem algumas horas de tratamento com agentes ativadores, para que haja a retomada da meiose e ativação completa. Esse tempo mínimo necessário pode explicar a diminuição nas freqüências de ativação observadas em oócitos tratados com demecolcina logo após a ativação. Resultados semelhantes foram relatados por Fischer Russel et al. (2005), que obtiveram baixas taxas de ativação, quando oócitos bovinos ativados foram expostos à demecolcina 30 minutos após o início da ativação. Os autores mencionam que a demecolcina, provavelmente, induziu a desestruturação dos microtúbulos, antes que os oócitos tivessem iniciado a progressão meiótica e segregação cromossômica, comprometendo a retomada da meiose. Os resultados obtidos por esses autores, e os dados oriundos deste estudo estão de acordo com relatos prévios, que mostram a necessidade de fusos intactos para que se tenha a degradação da ciclina B e, conseqüentemente, a inativação do MPF e saída da fase M (KUBIAK et al., 1993). Condizente com isso, oócitos em MII tratados com demecolcina antes da ativação partenogenética, permanecem na fase M, apesar da ocorrência de um padrão normal de oscilação de cálcio.

Os resultados obtidos neste estudo quanto às taxas de enucleação foram inferiores aos relatados por Fischer Russel et al. (2005), que observaram até 91,7% de



enucleação em oócitos bovinos ativados tratados com demecolcina. Porém, as altas taxas relatadas por esses autores foram avaliadas após 5 h de ativação, sendo que em nova avaliação realizada após 17 h do início da ativação, verificou-se que essas taxas não foram mantidas, com resultados variando entre 3,4 e 46,1% de enucleação. As hipóteses levantadas pelos autores foram de que os cromossomos teriam sido reintegrados ao oócito após incompleta extrusão do 2<sup>o</sup>CP ou então, teria ocorrido re-fusão dos CPs ao oócito, o que é menos provável.

Neste estudo, observou-se em vários oócitos a presença de material nuclear subcortical, conectado aos cromossomos presentes no CP por meio de um fuso remanescente, característica também verificada em oócitos murinos ativados (IBÁÑEZ et al., 2003). Uma incompleta liberação do CP pode ter ocorrido nesses oócitos tratados, como consequência da falta de microtúbulos intactos para a formação dos anéis contráteis, que são responsáveis pela citocinese (LARKIN e DANILCHIK, 1999). Ibáñez et al. (2003) relataram que pelo fato desse material encontrar-se em justaposição ao CP, o mesmo poderia ser retirado facilmente com auxílio de micromanipulação, o que foi feito no presente estudo.

Verificou-se também, que a exposição à demecolcina já pode ser interrompida a partir de 1,0 h de tratamento, o que também contribui para a otimização do protocolo já existente, que preconiza o tratamento por 2 horas (FISCHER RUSSEL et al., 2005), pelo fato de permitir micromanipulação mais precoce dos oócitos e menor tempo de exposição à droga.

O tratamento de oócitos ativados com demecolcina tem se mostrado efetivo para a enucleação em murinos (BAGUISI e OVERSTRÖM, 2000; GASPARRINI et al., 2003; IBÁÑEZ et al., 2003), caprinos (IBÁÑEZ et al., 2002) e bovinos (FISCHER RUSSEL et al., 2005; e o presente estudo); entretanto, diferenças espécie-específicas têm sido verificadas, com relatos de diferentes frequências de enucleação (20% até ~ 50%) e razões para essas diferenças ainda não foram esclarecidas, devido ao mecanismo de enucleação pela demecolcina não ter sido completamente caracterizado. O que está bem estabelecido é que a eficiência da enucleação depende do início do tratamento com demecolcina em relação ao processo de ativação. Assim, como a progressão

meiótica difere entre as espécies após o desencadeamento da ativação, esse poderia ser um dos fatores que explicariam as diferenças encontradas.

### **Dinâmica nuclear e de microtúbulos em oócitos ativados partenogeneticamente submetidos à EN química total**

Quando oócitos bovinos em MII são expostos à demecolcina, a ação desestabilizadora de microtúbulos provocada por esse agente é verificada em apenas 0,5 h de tratamento, com ausência completa dessas estruturas na maior parte dos oócitos avaliados (SARAIVA et al., 2009). Porém, no presente estudo, resultados diferentes foram observados a partir de oócitos ativados tratados com demecolcina.

A retomada da meiose após a fecundação ou ativação artificial de oócitos em MII é caracterizada pela segregação cromossômica para os pólos do fuso, alongamento e rotação do fuso meiótico e extrusão do 2° CP, que contém metade dos cromossomos do oócito (IBÁÑEZ et al., 2003)

Observou-se no decorrer do processo de ativação, aumento significativo de oócitos ativados a partir de 2,0 h do início do processo, resultado condizente com o esperado durante a ativação. Fischer Russel et al. (2005) avaliaram a progressão meiótica em oócitos bovinos ativados após 26 h de MIV, e observaram que 71,4% dos oócitos ainda apresentavam-se em MII após 30 min de ativação; parte dos oócitos progrediu para AII/TII após 1,0 - 1,5 h e após 5 h de ativação, 80,6% dos oócitos já se encontravam em TII, com extrusão do 2°CP.

Quando oócitos ativados foram expostos à demecolcina, verificou-se redução da densidade dos MTs, entretanto, sem ausência completa dessas estruturas na maioria dos oócitos avaliados. Os resultados obtidos neste experimento corroboram com os descritos em murinos (IBÁÑEZ et al. 2003), sendo que esses autores também observaram que os MTs não desapareceram completamente, mesmo após 2 h de tratamento.

A demecolcina liga-se com alta afinidade a dímeros de tubulina, impedindo a polimerização de microtúbulos, e resultando na perda da dinâmica de fuso em células

mitóticas e meióticas (IBÁÑEZ et al., 2003). A diminuição e menor densidade de MTs encontrada neste estudo, e também relatada por Ibáñez et al. (2003) e Gasparrini et al. (2003) provavelmente ocorreu devido à rápida atuação da demecolcina, cujos efeitos foram observados em apenas 15 minutos de tratamento em todos os trabalhos citados. Tani et al. (2006) observaram que os fusos começaram a desaparecer 3 minutos após o início do tratamento de oócitos em MII com demecolcina, alcançando 100% de desorganização aos 60 minutos, porém, sem desaparecimento completo dos MTs.

Como em trabalho anterior (SARAIVA et al., 2009) observou-se em oócitos em MII expostos à demecolcina ausência completa de MTs em apenas 0,5 h de tratamento, provavelmente o fuso meiótico presente em oócitos em MII é um alvo mais sensível à ação da demecolcina que o fuso presente em oócitos ativados. A presença desses fusos remanescentes pode refletir a estabilidade diferencial de alguns MTs no fuso, que provavelmente correspondem a MTs interpolares (COMBELLES et al., 2001).

Verificou-se no grupo exposto à demecolcina aumento significativo de oócitos com ausência de MTs apenas após 10 h do início da ativação. Assim, constatou-se ao final da avaliação, que aproximadamente 50% dos oócitos tratados apresentavam redução de MTs e 23% mostravam ausência completa dessas estruturas, de forma que apenas 28% dos oócitos apresentavam MTs evidentes.

Dessa maneira, aparentemente não houve repolimerização imediata dos MTs após cultivo em meio livre de demecolcina, diferentemente do que foi observado em oócitos tratados com a droga em MII (SARAIVA et al., 2009). Isso poderia trazer algumas conseqüências negativas ao desenvolvimento embrionário posterior, já que os microtúbulos são importantes durante as primeiras clivagens. Porém, é importante ressaltar que a redução de densidade dos microtúbulos ocorreu também em oócitos apenas ativados após 10 h do início do processo, o que pode demonstrar que se trata de um mecanismo “fisiológico”, já que embriões partenotos se desenvolvem normalmente na fase embrionária inicial.

### **Avaliação de atividade do Fator Promotor de Maturação (MPF) e da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) em oócitos utilizados na EN química parcial e na EN química total**

Os resultados do presente estudo, quanto à avaliação da atividade do MPF em oócitos bovinos em MII expostos à demecolcina (técnica A), mostram que a atividade média desse fator nos oócitos tratados foi estatisticamente semelhante à atividade presente em oócitos do grupo controle, no decorrer dos momentos avaliados. Observou-se diferença significativa apenas entre o início (0 h) e o final da avaliação (8 h), porém, sem manifestação estatística da adição de demecolcina ao meio de MIV.

Esses resultados não estão de acordo com aqueles obtidos por Tani et al. (2006) e Li et al. (2009), que observaram aumento significativo do MPF a partir de 0,5 h de exposição de oócitos bovinos à demecolcina. Porém, a concentração desse agente desestruturador de MTs utilizada pelos autores mencionados, foi dez vezes superior (0,5µg/mL) àquela em que oócitos deste estudo foram submetidos (0,05µg/mL).

Recentemente, Lan et al. (2008) também mostraram, em caprinos, a possibilidade do uso da demecolcina em concentrações mais baixas (0,8ng/mL), sendo que obtiveram cerca de 90% de formação de protrusão, e assim como neste estudo, não observaram mudanças significativas nos níveis de MPF.

A natureza dos “fatores reprogramadores” em mamíferos não está bem esclarecida. O fato de que quando células do *cumulus* fundidas com oócitos bovinos em MII enucleados são reprogramadas, mas não quando fundidas com oócitos ativados 6 horas antes (TANI et al., 2006) indica que o MPF é um candidato a fator reprogramador. Porém, existem controvérsias quanto à real necessidade de exposição do núcleo a um ambiente com alta atividade de MPF, sendo que outros fatores também estariam relacionados ao processo de reprogramação.

Quando núcleos somáticos são introduzidos em oócitos não ativados, ou seja, em MII, o envelope nuclear rompe-se rapidamente, e os cromossomos são expostos ao citoplasma do oócito e reprogramados (TANI et al., 2003). Isso indica que oócitos em MII possuem “fatores reprogramadores” em seu citoplasma. Porém, quando núcleos

somáticos são transferidos para oócitos que estão na fase S, ou seja, ativados partenogeneticamente, o envelope nuclear não se rompe, e ainda assim, os cromossomos das células doadoras são reprogramados durante o aumento do volume nuclear (TANI et al., 2003). O que se percebe é que há um limite de tempo de ativação para que o núcleo consiga se reprogramar e não ocorra ação prejudicial ao desenvolvimento.

Portanto, tem-se preconizado que o aumento do volume nuclear possui fundamental importância no processo de reprogramação, sendo atribuída ao MPF a função de provocar o rompimento da membrana nuclear, quando são utilizadas células somáticas nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (TANI et al., 2003). Dessa forma, o MPF torna-se essencial para que haja adequado rompimento da membrana do núcleo, porém, não como fator reprogramador direto.

Gonda et al. (2003) demonstraram a ação de uma proteína, denominada FRGY2, sobre o desarranjo do núcleo somático; porém, não está claro se essa proteína pode converter o núcleo somático em totipotente.

Assim, é provável que a demecolcina, em altas concentrações, cause aumento de MPF, já que ao desestruturar os fusos inibe a degradação da ciclina B, levando ao conseqüente aumento do MPF (NIXON et al., 2002). Como existem suspeitas de que o MPF não seja um fator reprogramador direto e, levando-se em consideração, que menores concentrações (0,05µg/mL) são mais eficientes que aquelas utilizadas rotineiramente (0,4 – 0,5µg/mL) na indução de formação de protrusão (SARAIVA et al. 2009), concluímos que não existem razões para que a concentração de demecolcina seja alterada, a não ser que se tenha a comprovação da atuação desse agente na reprogramação nuclear.

Quanto à atividade da MAPK, não foram verificadas diferenças significativas entre os vários momentos avaliados na técnica A, resultado que está de acordo com os dados obtidos por Tani et al. (2006), que observaram atividade constante da MAPK, a despeito da exposição à demecolcina por diferentes momentos. Existem relatos que mostram alteração da atividade da MAPK quando oócitos maturados são expostos à demecolcina (LAN et al., 2008; LI et al., 2009), mas as condições utilizadas por esses

autores foram diferentes das condições adotadas neste estudo, como por exemplo, o tempo de maturação oocitária (15 h) e a concentração de demecolcina (0,4µg/mL) que neste estudo foram 19 a 20 h de MIV e 0,05µg/mL, respectivamente.

Quando oócitos oócitos ativados foram utilizados (técnica B), houve diminuição significativa da atividade MPF após 0,5 h de ativação. Resultados próximos foram relatados por Tani et al. (2003), que observaram em bovinos diminuição da atividade do MPF após 1,0 h de ativação com ionomicina e cicloheximide. É importante ressaltar que, mesmo nos grupos expostos à demecolcina, a atividade do MPF decaiu de forma semelhante ao grupo controle durante o processo de ativação, o que é de extrema importância para que os eventos da ativação ocorram normalmente, com a extrusão do segundo corpúsculo polar, a formação de pronúcleos e o início das divisões mitóticas (KÜPKER et al., 1998).

Na técnica B, observou-se diminuição significativa da atividade da MAPK apenas 8,0 h após o início da ativação, tanto no grupo exposto à demecolcina quanto no grupo controle, evidenciando que o tratamento não apresentou efeitos, por si só, na atividade da MAPK.

Outros autores (VERLHAC et al., 1994; LIU et al., 1998; TIAN et al., 2002), também observaram que a inativação da MAPK ocorre mais tardiamente em relação ao MPF em oócitos ativados. Como o período de inativação da MAPK coincide com a formação de pronúcleos, Tian et al. (2002) levantam a hipótese de que a inativação da MAPK possa ser um pré-requisito (“check-point”) para o ciclo celular proceder a formação da membrana nuclear e, portanto, a formação dos pronúcleos.

Pode-se concluir neste estudo, que a demecolcina não apresentou efeitos na atividade MAPK, já que não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e tratado em todos os momentos avaliados.

### **Avaliação da eficiência de diferentes técnicas de enucleação: Convencional, EN química parcial e EN química total**

Embora existam vários relatos de avanços na técnica de TN nos últimos anos, ainda é verificada baixa eficiência da clonagem, com altos índices de mortalidade embrionária, fetal, peri e pós-natal. Na tentativa de minimizar as injúrias causadas aos oócitos durante o procedimento de enucleação, técnicas alternativas de enucleação química têm sido relatadas, permitindo inclusive nascimentos em várias espécies, como murinos (BAGUISI e OVERSTROM, 2000; GASPARRINI et al., 2003), coelhos (YIN et al., 2002a), suínos (YIN et al., 2002b; KAWAKAMI et al., 2003), caprinos (LAN et al., 2008) e bovinos (LI et al., 2009).

No presente estudo, foram avaliadas as eficiências dos processos de enucleação química, que se mostraram satisfatórias nas duas técnicas avaliadas (EN Parcial – 80,9% e EN total – 81,8% de enucleação) e superiores à eficiência obtida por meio da técnica convencional (64,2% de enucleação).

A exposição de oócitos em MII à demecolcina tem proporcionado altas taxas de enucleação em suínos (93% - YIN et al., 2002b; 95% - KAWAKAMI et al., 2003) e em bovinos (96% - LI et al., 2004; 98% - VAJTA et al., 2004) e, portanto, o resultado obtido neste estudo com relação à técnica de enucleação parcial está próximo ao esperado, mostrando que a técnica de enucleação assistida pela demecolcina apresenta alta confiabilidade em oócitos bovinos, eliminando a necessidade do uso de corantes específicos de DNA, responsáveis por vários danos causados aos oócitos (SMITH, 1993; DOMINKO et al., 2000). Semelhante aos nossos resultados, Yin et al. (2002b) e Kawakami et al. (2003) obtiveram em seus estudos com oócitos de suínos, maior eficiência na enucleação assistida pela demecolcina (92 a 95%) do que no procedimento tradicional, no qual se realiza aspiração de parte do citoplasma ao redor do 1º corpúsculo polar (eficiência de 67% a 79%). Da mesma maneira, Tani et al. (2006) verificaram em oócitos bovinos, taxas superiores de enucleação quando utilizaram a demecolcina (~ 100%).

Quanto à eficiência da técnica de enucleação química total, os resultados obtidos neste estudo também foram satisfatórios (81,8% de enucleação) e corroboram com aqueles verificados por Fischer Russel et al. (2005) em oócitos bovinos, que obtiveram taxa de 75,0% a 85,7% de enucleação quando utilizaram protocolo semelhante ao deste estudo. Porém, no trabalho citado não foi realizada a retirada do 2º CP e assim, os autores constataram que houve reintegração dos cromossomos ao oócito, de forma que as taxas de enucleação avaliadas após 17 h do início da ativação foram inferiores (3,4 a 46,1%). Assim, concluímos que a retirada mecânica do 2º CP e mínima quantidade de citoplasma ao redor, que foi realizada neste trabalho, é necessária para que o processo de enucleação seja efetivo em oócitos bovinos, da mesma maneira que foi verificado em camundongos (GASPARRINI et al., 2003 e IBÁÑEZ et al., 2003).

Resultados interessantes foram obtidos quanto às taxas de fusão de células doadoras embrionárias com citoplastos fornecidos pelas três técnicas avaliadas neste estudo. Apesar do processo de fusão não ter sido muito eficiente (~ 50 a 65%), já que taxas entre 80% e 90% são descritas em vários trabalhos da literatura, observou-se que as duas técnicas de enucleação química possibilitaram maiores taxas de fusão (60,4% e 65,9%, respectivamente nas técnicas EN parcial e EN total) que o procedimento convencional (53,9%). Isso pode ser atribuído, provavelmente, à maior quantidade de citoplasma presente nesses citoplastos, que por sua vez, fornecem maior contato entre a célula e a membrana plasmática do oócito, além do processo de enucleação química ser menos invasivo, e portanto, causar menor injúria e lise ao oócito enucleado, o que também influencia na adesão da célula doadora.

As taxas de clivagem variaram entre 61,9% e 76,6% entre os grupos reconstituídos pelas diferentes técnicas, e a produção de blastocistos, entre 13,9% e 29,2%. Porém, maiores conclusões quanto ao desenvolvimento embrionário não podem ser inferidas por este estudo, pelo fato do número amostral ter sido pequeno.

Quanto ao uso da técnica de enucleação assistida pela demecolcina em oócitos bovinos, foram encontrados relatos de taxas de desenvolvimento entre 30,2 e 47,0% de produção de blastocistos (LI et al., 2004; VAJTA et al., 2004; TANI et al., 2006; LI et al., 2009), resultados próximos aos descritos na literatura com o uso da técnica



convencional, mas que mostram ação não prejudicial desse agente, pelo menos na fase de desenvolvimento inicial.

Entretanto, existem várias justificativas para o uso da demecolcina no processo de TN. Inicialmente, embora Li et al. (2009) não tenham observado maior taxa de blastocistos quando utilizaram a droga, os autores obtiveram taxas de eclosão e número de células embrionárias muito maiores em todos os grupos tratados. Ainda, a enucleação assistida quimicamente permite a remoção dos cromossomos sem eliminar o fuso meiótico (COSTA-BORGES et al., 2009). De acordo com Simerly et al. (2003, 2004), a remoção do fuso meiótico durante a enucleação convencional parece ser responsável pelo baixo desenvolvimento de embriões reconstituídos com células somáticas, em primatas, pelo fato do centrôssomo e de algumas proteínas motoras, como a NuMA e a KIFC1, que são vitais para a formação do pólo do fuso mitótico, serem depletados do ooplasma, resultando em disfunções do fuso e em embriões aneuplóides.

Além disso, a enucleação mecânica tradicional diminui a quantidade de  $\gamma$ -tubulina associada ao fuso em oócitos murinos (VAN THUAN et al., 2006). Diante desse cenário, métodos alternativos de enucleação oocitária poderiam permitir a conservação de fatores associados ao fuso nos oócitos enucleados, o que poderia ser traduzido em maior qualidade embrionária. Assim, como parte do processo de avaliação da qualidade desses embriões, fizemos um estudo do padrão de expressão de alguns genes importantes durante o desenvolvimento inicial.

### **Avaliação da expressão de genes relacionados ao cromossomo X e à adaptação ao estresse em embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro***

No presente trabalho, investigou-se o padrão de expressão de três genes que são muito importantes durante o desenvolvimento inicial, sendo dois deles ligados ao cromossomo X: *XIST*, relacionado ao processo de inativação do cromossomo X, e *G6PD*, também ligado ao cromossomo X e, portanto, sujeito à dosagem compensatória

após a inativação de um dos cromossomos, e o terceiro (*HSPA1A*), identificado como um indicador sensível de estresse embrionário no período pré-implantação.

Uma possível causa para o sucesso limitado da clonagem é a incorreta reprogramação do núcleo transferido em embriões reconstituídos. No embrião clonado, a reprogramação nuclear ocorre em um contexto celular totalmente diferente daquele da gametogênese, e em um curto período de tempo, correspondente ao intervalo entre a fusão do núcleo ao citoplasto e a ativação do genoma embrionário.

Dados da literatura sugerem que mecanismos de regulação transcripcional sofram prejuízos durante o processo de reprogramação nuclear, em virtude do bloqueio da transcrição do genoma somático, e o restabelecimento da expressão gênica embrionária (McGRAW et al., 2002).

De maneira geral, as taxas de sucesso da TN são extremamente baixas, sendo que apenas 0,9% a 5% dos embriões clonados geram animais vivos e saudáveis (WILMUT et al., 2002; CAMPBELL et al., 2005). Estudos que analisam as modificações epigenéticas em animais clonados indicam que a reprogramação incorreta pode ser parcialmente responsável pela baixa taxa de sucesso (EGGAN et al., 2000; BOIANI et al., 2002; BORTVIN et al., 2003)

A intensa manipulação dos embriões durante os procedimentos de TN, além da exposição a diferentes temperaturas, atmosferas e meios de cultivo, têm causado alterações nos padrões de metilação de vários genes, que por sua vez, podem induzir a erros de expressão, levando a diversas anomalias (DEAN et al., 1996; KONO et al., 1998; YOUNG e FAIRBURN, 2000). Além das condições de cultivo *in vitro* (WRENZYCKI et al., 1999, 2001a), o protocolo utilizado na transferência nuclear também pode refletir em alterações nos padrões de expressão gênica (WRENZYCKI et al., 2001b).

Um estudo realizado em clones bovinos analisou a expressão do gene *XIST* e de outros 10 genes ligados ao X em animais vivos e mortos (WILMUT et al., 1997). Foram observados dois padrões de inativação do cromossomo X (ICX), de acordo com a viabilidade dos clones analisados. Enquanto em fibroblastos de clones vivos a ICX ocorreu de forma aleatória normal, nos clones mortos observou-se um padrão complexo

e inédito de ICX em todos os órgãos analisados, de maneira que, em cada órgão, pelo menos dois genes ligados ao X estavam silenciados em ambos os cromossomos X.

Como a verificação de transcritos de alguns genes essenciais ao desenvolvimento fornece uma potencial ferramenta para avaliação da normalidade embrionária (NIEMANN et al., 2000), realizamos um estudo comparando os níveis de expressão de três genes que apresentam especial manifestação na fase inicial do desenvolvimento embrionário.

Inicialmente, foram avaliados os níveis de expressão desses genes em embriões reconstituídos a partir de células doadoras embrionárias, comparando esses valores aos apresentados por embriões fecundados *in vitro* e *in vivo*, e ativados partenogeneticamente.

As razões de expressão do *GAPDH* apresentaram diferenças entre os grupos, especialmente para as comparações envolvendo os grupos fecundados (*in vivo* e *in vitro*) versus os micromanipulados. Perecin et al. (2009) encontraram resultados semelhantes quanto à expressão do *GAPDH* em embriões avaliados individualmente, e relataram que, considerando que os genes de expressão constitutiva estão correlacionados à quantidade total de poli (A) RNAm, sugere-se que, embora as quantidades relativas assemelhem-se, ocorram diferenças nas quantidades totais dos transcritos desses genes.

Com relação ao gene *XIST*, foi verificado neste estudo um padrão inesperado de expressão em embriões do sexo masculino. Alguns embriões dos grupos *In vitro* M, EN conv M e EN parcial M apresentaram transcritos do *XIST* em níveis semelhantes aos encontrados em embriões do sexo feminino. Porém, a proporção de embriões femininos em que se verificou a presença de transcritos do *XIST* foi maior que a proporção verificada em embriões masculinos, sendo que praticamente todas as amostras de fêmeas amplificaram para o referido gene e apenas um ou dois embriões de cada grupo masculino apresentaram o mesmo padrão. Ainda, nos grupos *In vivo* M e EN total M, não foi constatada a presença desses transcritos. Considerando o grupo *in vivo* como o mais próximo da normalidade, concluímos que as técnicas realizadas *in vitro*

influenciaram na expressão do *XIST*, sendo que a única técnica de TN a não mostrar essa alteração foi a que envolve enucleação química total (EN total).

Antes da inativação do cromossomo X, ocorre expressão do *XIST* a partir dos dois cromossomos X, e esse RNA permanece apenas no local da transcrição, propagando-se e acumulando-se do centro de inativação do X (CIX) ao longo de todo o comprimento do cromossomo destinado ao silenciamento. Em bovinos, o *XIST* foi detectado em embriões no estágio de duas células e, em maior quantidade, em embriões de oito células, no momento da ativação do genoma embrionário (TELFORD et al., 1990). Contudo, a replicação tardia do cromossomo X inativo foi somente detectada no estágio de blastocisto inicial, no sétimo dia do desenvolvimento *in vitro* (DE LA FUENTE et al., 1999). Esses autores relataram que a inativação do cromossomo X inicia-se em bovinos no estágio de blastocisto e completa-se no 14º dia de desenvolvimento, ocorrendo a partir daí o mecanismo de dosagem compensatória dos genes ligados ao cromossomo X.

Os resultados deste estudo, obtidos a partir de embriões reconstituídos com células doadoras embrionárias, não mostraram diferenças significativas quanto às frequências de transcritos dos genes *XIST* e *G6PD* nas comparações entre embriões clonados pelas diferentes técnicas e embriões fecundados (*in vitro* e *in vivo*). Como existem relatos de alterações na expressão relativa desses genes em embriões clonados (WRENZYCKI et al., 1999, 2001b, 2002, 2003; MERIGHE et al., 2009), acredita-se que a natureza da célula tenha contribuído para a correta reprogramação observada nos mesmos, quando leva-se em consideração a expressão dos referidos genes.

O transcrito do gene *XIST* é tido como responsável pelo sinal citológico da inativação do cromossomo X durante o estágio de blastocisto (DE LA FUENTE et al., 1999). Porém, mesmo após a expressão do *XIST*, níveis dimórficos de transcritos ligados ao X persistem no embrião no estágio de blastocisto. Dessa maneira, o papel do *XIST* como precursor da inativação do cromossomo X durante o desenvolvimento embrionário ainda não está bem esclarecido.

Transcritos de *XIST* foram detectados em zigotos, embriões nas primeiras clivagens (DANIELS et al., 1997) e blastocistos humanos (RAY et al., 1997), além de blastocistos bovinos (PEIPPO et al., 2001; MERIGHE et al., 2009) e de camundongos (LEE et al., 1999) do sexo masculino. Esses dados sugerem que, como o *XIST* foi detectado tanto em embriões masculinos quanto femininos, exista algum outro mecanismo envolvido no processo de inativação, que juntamente ao *XIST* desempenha papel na escolha do cromossomo X a ser inativado (DANIELS et al., 1997).

Embora ainda permaneça a dúvida sobre o exato papel do gene *XIST* na inativação de um dos cromossomos X, ou na escolha do cromossomo X que deve permanecer ativo, o que está claro é que em bovinos, humanos e camundongos, transcritos do gene *XIST* estão presentes em embriões masculinos e femininos durante o período pré-implantação (WRENZYCKI et al., 2002) e assim, os resultados do presente estudo reforçam essa informação.

A partir do momento em que a inativação do X propaga-se pelos vários ciclos (DE LA FUENTE et al., 1999), a equalização dos níveis dos transcritos de genes ligados ao cromossomo X ocorre gradualmente. Neste trabalho, a frequência de transcritos do gene *G6PD* não foi diferente entre embriões dos dois sexos, no estágio de blastocisto, reconstituídos com células embrionárias ou fecundados.

Lucas-Hahn et al. (2001) observaram que, enquanto os níveis de *G6PD* foram maiores em blastocistos bovinos femininos do que masculinos em embriões produzidos *in vitro*, os níveis encontrados para os dois sexos nos embriões produzidos *in vivo* foram similares. Isso mostra que as condições de cultivo *in vitro* podem apresentar grande influência nos padrões de expressão gênica e desenvolvimento embrionário. Como neste estudo, também não foram constatadas diferenças entre os referidos grupos, isso talvez reflita melhores condições do sistema de produção *in vitro* utilizado. Com relação aos grupos reconstituídos, mais uma vez, acredita-se que o tipo de célula doadora (embrionária) tenha permitido um correto processo de reprogramação nuclear.

Quando avaliaram-se os níveis de expressão dos três genes (*XIST*, *G6PD* e *HSPA1A*) em embriões reconstituídos a partir de células somáticas, os padrões observados já foram diferentes. Comparando-se os grupos reconstituídos com os

grupos controle (*in vitro* e partenogenético) não foram obtidas diferenças significativas nas freqüências de transcritos, porém, ao serem comparados os dois grupos reconstituídos, verificou-se que o grupo exposto à demecolcina (EN parcial) apresentou maiores níveis de expressão relativa dos genes *XIST* e *G6PD* que o grupo convencional.

Sugere-se que a sobrevivência do embrião possa estar relacionada à sua capacidade em manter a homeostase celular em relação ao meio. A enzima G6PD, contribuindo na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS), se torna responsável por manter esse equilíbrio celular (RIEGER, 1992; IWATA et al., 1998; NICOL et al., 2000).

Devido à importância do gene *G6PD* no estresse oxidativo, embriões e fetos que apresentem deficiência desse gene são mais susceptíveis ao estresse oxidativo que os demais indivíduos (RIEGER et al., 1992). Como foi evidenciado neste estudo maior nível de expressão do gene *G6PD* em embriões expostos previamente à demecolcina (reconstituídos com células somáticas) quando comparados àqueles obtidos por procedimentos convencionais, sugere-se que esses embriões, possivelmente, possuam melhor mecanismo de reprogramação nuclear. Lopes et al. (2007) correlacionaram maiores freqüências de transcritos de *G6PD* em embriões com altas taxas de atividade respiratória, e assim, sugerem que a obtenção de altos níveis de expressão desse gene talvez seja indicativo de viabilidade embrionária.

Ao serem avaliadas as freqüências de transcritos do gene *HSPA1A*, observou-se neste estudo diferença entre os sexos em embriões produzidos *in vivo*, sendo que menores níveis de expressão foram observados em machos. Maior expressão relativa também foi observada em fêmeas oriundas da técnica convencional de TN (reconstituídas com células embrionárias) quando comparadas a embriões masculinos obtidos *in vivo*. Assim, aparentemente, a diferença na expressão do *HSPA1A* entre os sexos reflete uma situação de normalidade.

Na avaliação de embriões reconstituídos com células somáticas não foram verificadas diferenças entre os grupos quanto à expressão desse gene, porém, apenas embriões derivados de células doadoras femininas foram avaliados neste estudo. Não

foram encontrados relatos adicionais de avaliação de transcritos do *HSPA1A* em embriões reconstituídos por diferentes técnicas de enucleação.

Entretanto, embora não tenham ocorrido diferenças de expressão entre embriões oriundos das diversas técnicas, alguns autores têm relatado menor expressão desse gene em embriões clonados após alteração do protocolo de ativação (WRENZYCKI et al., 2001).

Como os resultados anteriores sugerem que as condições de cultivo *in vitro* deste estudo são satisfatórias, possivelmente, a expressão constante do *HSPA1A*, que é um indicador sensível de estresse, verificada nos diferentes grupos, reforça essa afirmação, já que a regulação da expressão desse gene pode ser afetada por condições inadequadas de cultivo e por uma variedade de agentes estressantes, como aminoácidos, aumento de temperatura, hormônios esteróides e outros.

## 7. CONCLUSÕES

- O processo de enucleação pôde ser iniciado a partir de 1,0 h de tratamento com demecolcina, tanto na técnica de enucleação química parcial quanto na técnica de enucleação química total;
- A demecolcina prejudicou a progressão meiótica quando foi adicionada ao meio durante o desencadeamento do processo de ativação, devendo ser utilizada apenas após 1,5 h do início do processo;
- A técnica de EN química total provocou a redução da densidade dos microtúbulos, porém, essas estruturas não desapareceram completamente na maioria dos oócitos, mesmo após tratamento com demecolcina por 2 horas;
- O MPF e a MAPK não foram afetados pelos processos de EN química parcial e EN química total quando a demecolcina foi utilizada em baixas concentrações (0,05µg/mL);
- As técnicas de EN química parcial e EN química total permitiram o desenvolvimento de embriões reconstituídos por TN até o estágio de blastocisto, e a expressão relativa dos genes *XIST*, *G6PD* e *HSPA1A* não foi alterada entre embriões dos dois sexos quando foram utilizadas células embrionárias como doadoras de núcleo;
- A técnica de EN química parcial levou a incrementos na expressão relativa dos genes *XIST* e *G6PD*, ligados ao cromossomo X e muito importantes na fase de desenvolvimento embrionário inicial, em embriões reconstituídos por TN a partir de células somáticas.



## 8. IMPLICAÇÕES

No presente estudo, observou-se que a demecolcina possibilitou a obtenção de citoplastos viáveis ao processo de reconstituição por transferência nuclear (TN), permitindo adequado desenvolvimento embrionário e, possivelmente, auxiliando no processo de reprogramação nuclear quando foram utilizadas células doadoras somáticas. Provavelmente, isso reflete a presença de maior volume citoplasmático e menores injúrias sofridas pelos oócitos receptores fornecidos pelas técnicas de enucleação auxiliadas quimicamente, e menor tempo de micromanipulação, além da conservação de fatores associados ao fuso nos oócitos enucleados.

Assim, os resultados obtidos neste estudo mostram que o uso da demecolcina é uma importante ferramenta no procedimento de TN. Estudos adicionais com a avaliação de maior número de genes, como por exemplo, pelas técnicas de microarranjos, além da avaliação da manutenção de gestações *in vivo* e produção de animais saudáveis certamente auxiliarão na melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na reprogramação nuclear em clones e na consolidação do uso das técnicas de enucleação auxiliadas quimicamente.

## 9. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J., RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 4. ed., New York: Garland Science, 2002. 1493p.

AVERY, B.; JORGENSEN, C. B.; MADISON, V.; GREVE, T. Morphological development and sex of bovine *in vitro*-fertilized embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, Cambridge, v. 32, p. 265-270, 1992.

AVERY, B.; MADISON, V.; GREVE, T. Sex and development in bovine *in-vitro*-fertilized embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v.35, p. 953-963, 1991.

BAGUISI, A.; BEHDOODI, E.; MELICAN, D. T.; POLLOCK, J. S.; DESTREMPES, M. M.; CAMMUSO, C.; WILLIAMS, J. L.; NIMS, S. D.; PORTER, C. A.; MIDURA, P.; PALACIOS, M. J.; AYRES, S. L.; DENNISTON, R. S.; HAYES, M. L.; ZIOMEK, C. A.; MEADE, H. M.; GODKE, R. A.; GAVIN, W. G.; OVERSTROM, E. W.; ECHELARD, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat. Biotechnol.**, New York, v.17, p.456-461, 1999.

BAGUISI, A.; OVERSTROM, E. W. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. **Theriogenology**, Stoneham, v.53, p.209, 2000.

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

BARNES, F.L.; COLLAS, P.; POWELL, R.; KING, W.A.; WESTHUSIN, M.; SHEPHERD, D. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.36, p.33-41, 1993.

BARTELS, P.; JOUBERT, J.; De la REY, M.; De la REY, R.; TREADWELL, R.; CALLESEN, H.; VAJTA, G. Birth of Africa's first nuclear transferred animal produced with handmade cloning. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v.16, p.136, 2004.

BARTON, N. R.; GOLDSTEIN, L. S. B. Going mobile: microtubule motors and chromosome segregation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.93, p.1735-1742, 1996.

BAVISTER, B.D. Interactions between embryos and the culture milieu. **Theriogenology**, Stoneham, v.53, p.619-626, 2000.

BETTHAUSER, J.; FORSBERG, E.; AUGENSTEIN, M.; CHILDS, L.; EILERTSEN, K.; ENOS, J.; FORSYTHE, T.; GOLUEKE, P.; JURGELLA, G.; KOPPANG, R.; LESMEISTER, T.; MALLON, K.; MELL, G.; MISICA, P.; PACE, M.; PFISTER-

GENSKOW, M.; STRELCHENKO, N.; VOELKER, G.; WATT, S.; THOMPSON, S.; BISHOP, M. Production of cloned pigs from in vitro systems. **Nat. Biotechnol.**, New York, v.18, p.1055-1059, 2000.

BEYHAN, Z.; MITALIPOVA, M.; CHANG, T.; FIRST, N.L. Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos produced using different types of adult donor cells. **Theriogenology**, Stoneham, v.53, p.210, 2000.

BHOJWANI, S.; VAJTA, G.; CALLESEN, H.; ROSCH LAU, K.; KUWER, A.; BECKER, F.; ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; POEHLAND, R. Developmental competence of HMD<sup>TM</sup> derived bovine cloned embryos obtained from somatic cell nuclear transfer of adult fibroblasts and granulosa cells. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.51, p.465-475, 2005.

BOIANI, M.; ECKARDT, S.; SCHOLER, H.R.; McLAUGHLIN, K.J. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, N.Y, v.16, p.1209-1219, 2002.

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

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

BORTVIN, A.; EGGAN, K.; SKALETSKY, H.; AKUTSU, H.; BERRY, D.L.; YANAGIMACHI, R.; PAGE, D.C.; JAENISCH, R. Incomplete reactivation of Oct-4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. **Development**, Cambridge, v.130, p.1673-1680, 2003.

BOS-MIKICH, A.; WHITTINGHAN, D.G.; JONES, K.T. Meiotic and mitotic Ca<sup>2+</sup> oscillations affect cell composition in resulting blastocysts. **Dev. Biol.**, San Diego, v.182, p.172-179, 1997.

BREM, G.; KUHHLZER, B. The recent history of somatic cloning in mammals. **Cloning Stem Cells**, New York, v.4, p.57-63, 2002.

BRIGGS, R.; KING, T. J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 38, p.455-463, 1952.

BRUNET, S.; VERNOS, I. Chromosome motors on the move. **EMBO Rep.**, Oxford, v.2, p.669-673, 2001.

BUENDIA, B.; DRAETTA, G.; KARSENTI, E. Regulation of microtubule nucleating activity of centrosomes in *Xenopus* egg extracts. **J. Cell Biol.**, New York, v.116, p.1431-42, 1992.

BURKE, J. Texas A&M University - CVM Researchers first to clone White-tailed Deer. Disponível em: <[http://www.cvm.tamu.edu/news/releases/2003/deer\\_clone.shtml](http://www.cvm.tamu.edu/news/releases/2003/deer_clone.shtml)>, 2003. Acesso em: 03.09.2009.

CAMOUS, S. ; KOPECNY, V. ; FLECHON, JE. Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo. **Biol. of the Cell**, San Diego, v.58, p.195–200, 1986.

CAMPBELL, K.H.S. A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine. **J. Anat.**, Hoboken, v.200, p.267-275, 2002.

CAMPBELL, K.; ALBERIO, R.; CHOI, I.; FISHER, P.; KELLY, R.; LEE, J.H.; MAALOUF, W. Cloning: eight years after Dolly. **Reprod. Domest. Anim.**, Belfast, v.40, p.256-268, 2005.

CAMPBELL, K. H. S.; LOI, P.; OTAEGUI, P.J.; WILMUT, I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. **Rev. Reprod.**, Colchester, v.1, p.40-46, 1996.

CAMPBELL, K.H.S.; RITCHIE, W.A.; WILMUT, I. Nuclear–cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.49, p.933–942, 1993.

CENTONZE, V.E.; BORISY, G.G. Nucleation of microtubules from mitotic centrosomes is modulated by a phosphorylated epitope. **Cell Sci.**, New York, v.95, p.405-11, 1990.

CHAN, A.W.S. Transgenic animals: current and alternative strategies. **Cloning**, Larchmont New York, v.1, p.25-46, 1999.

CHAVATTE-PALMER, P.; REMY, D.; CORDONNIER, N.; RICHARD, C.; ISSENMAN, H.; LAIGRE, P.; HEYMAN, Y.; MIALOT, J-P. Health status of cloned cattle at different ages. **Cloning Stem Cells**, New York, v.6, p.94-100, 2004.

CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; MONGET, P.; LeBOURHIS, D.; KANH, G.; CHILLIARD, Y.; VIGNON, X.; RENARD, J.P. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.66, p.1596-1603, 2002.

CHEONG, H.; TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.48, p.958-963, 1983.

CHESNE, P. ; ADENOT, P.G. ; VIGLIETTA, C. ; BARATTE, M. ; BOULANGER, L. ; RENARD, J.P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nat. Biotechnol.**, New York, v.20, p.366- 369, 2002.

CHRISTMANN, L.; JUNG, T.; MOOR, R.M. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.38, p.85-90, 1994.

CIBELLI, J. B.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; KANE, J. J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONCE DE LEON, F. A.; ROBL, J. M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, Washington, v.280, p.1256-1258, 1998.

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

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

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

COMBELLES, C.M.; ALBERTINI, D.F. Microtubule patterning during meiotic maturation in mouse oocytes is determined by cell cycle-specific sorting and redistribution of  $\gamma$ -tubulin. **Dev. Biol.**, v.239, p.281-294, 2001.

CONSTANT, F.; GUILLOMOT, M.; HEYMAN, Y.; VIGNON, X.; LAIGRE, P.; SERVELY, J. L.; RENARD, J. P.; CHAVATTE-PALMER, P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.75, p.122-130, 2006.

CORLEY-SMITH, G.E.; BRANDHORST, B.P. Preservation of endangered species and populations: a role for genome banking, somatic cell cloning, and androgenesis? **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.53, p.363-367, 1999.

COSTA-BORGES, N.; PARAMIO, M.T.; CALDERÓN, G.; SANTALÓ, J.; IBÁÑEZ, E. Antimitotic treatments for chemically assisted oocyte enucleation in nuclear transfer procedures. **Cloning Stem Cells**, Larchmont New York, v.11, p.153-166, 2009.

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

DANIELS R., HALL V.J., FRENCH A.J., KORFIATIS N.A., TROUNSON A.O. Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.60, n.3, p.281-288, 2001.

DANIELS, R.; HALL, V.; TROUNSON, A. O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.63, p.1034-1040, 2000.

DANIELS, R.; ZUCCOTTI, M.; KINIS, T.; SERHAL, P. XIST expression in human oocytes and preimplantation embryos. **Am. J. Hum. Genet.** Baltimore, v.61, p.33-39, 1997.

DEKEL, N. Molecular control of meiosis. **Trends Endocrinol. Metab.**, New York, v.6, p.165-169, 1995.

DE LA FUENTE, R.; HAHNEL, A.; BASRUR, P.K.; KING, W.A. X inactive-specific transcript (XIST) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.60, p.769-775, 1999.

De SOUSA, P. A.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L. E.; WALKER, S. K.; WILMUT, I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.65, p.23-30, 2001.

De SOUSA, P. A.; WINGER, Q.; HILL, J. R.; JONES, K.; WATSON, A. J.; WESTHUSIN, M. E. Reprogramming of fibroblast nuclei after transfer into bovine oocytes. **Cloning**, Larchmont New York, v.1, p.63-69, 1999.

DESSEV, G.; IVCHEVA-DESSEV, C.; BISCHOFF, J.; BEACH, D.; GOLDMAN, R. A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles the nuclei of clam oocytes in vitro. **J. Cell Biol.**, New York, v.112, p.523-33, 1991.

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

DYBAN, A.P.; LEE, K.; O'NEILL, G.T.; SPEIRS, S.; KAUFMAN, M.H. Cytogenetic study of silver staining NOR in 8-cell-stage mouse blastomeres fused to 1-cell-stage embryos. **Development**, Cambridge, v.104, p.453-463, 1988.

EGGAN, K.; AKUTSU, H.; HOCHEDLINGER, K.; RIDEOUT III, W.; YANAGIMACHI, R.; JAENISCH, R. X-chromosome inactivation in cloned mouse embryos. **Science**, Washington, v. 290, p.1578-1581, 2000.

EGGAN, K.; JAENISCH, R. Micromanipulating dosage compensation: understanding X chromosome inactivation through nuclear transplantation. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, Oakland, v.14, p.349-358, 2004.

ELSHEIKH, A. S.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Developmental ability of mouse late 2-cell stage blastomeres fused to chemically enucleated oocytes in vitro. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v.59, p.107-113, 1997.

ELSHEIKH, A. S.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S.; KANAGAWA, H. Functional enucleation of mouse metaphase II oocytes with etoposide. **J. Vet. Res.**, Chicago, v.45, p.217-220, 1998.

ENRIGHT, B. P.; KUBOTA, C.; YANG, X.; TIAN, X. C. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2-deoxycytidine. **Biol. Reprod.**, New York, v.69, p.896–901, 2003.

FABER, D.C.; FERRE, L.B.; METZGER, J.; ROBL, J.M.; KASINATHAN, P. Agro-economic impact of cattle cloning. **Cloning Stem Cells**, New York, v.6, p.198-207, 2004.

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

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

FISSORE, R.A.; DOBRINSKY, J.R.; BALISE, J.J.; DUBY, R.T.; ROBL, J.M. Patterns of intracellular  $Ca^{2+}$  concentrations in fertilized bovine eggs. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.47, p.960-969, 1992.

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

FULKA, J.; MOOR, R.M. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.34, p.427-430, 1993.

GALLI, C.; DUCHI, R.; MOOR, R.M.; LAZZARI, G. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. **Cloning**, Larchmont New York, v.1, n.3, p.161-170, 1999.

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

GAO, S.; CHUNG, Y.G.; PARSEGHIAN, M.H.; KING, G.J.; ADASHI, E.Y.; LATHAM, K.E. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. **Dev. Biol.**, San Diego, v.266, p.62-75, 2004.

GARTNER, K.; BONDIOLI, K.; HILL, K.; RAPP, K. High variability of body sizes within nucleus transfer clones of calves: artifacts or a biological feature? **Reprod. Domest. Anim.**, Berlin, v. 33, p. 67-75, 1998.

GASPARRINI, B.; DINNYES, A.; AINSLIE, A.; MARSHALL, C.; RITCHIE, W. A.; TRAVERS, A.; WILMUT, I.; De SOUSA, P. A. Attempted chemical enucleation of *in vitro* matured sheep oocytes after activation and their use in nuclear transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v.57, p.414, 2002.

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

GONDA, K.; FOWLER, J.; KATOKU-KIKYO, N.; HROLDSON, J.; WUDEL, J.; KIKYO, N. Reversible disassembly of somatic nucleoli by the germ cell proteins FRGY 2a and FRGY 2b. **Nat. Cell Biol.**, London, v.5, p.205–210, 2003.

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

GURDON, J.B. The transplantation of living cell nuclei. **Adv. Morphog.**, New York, v.4, p.1–41, 1964.

HAGEMANN, L. J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. **Theriogenology**, Stoneham, v.51, p.449-459, 1999.

HAMANO, K. Sex preselection in bovine by separation of X- and Y-chromosome 411 bearing spermatozoa. **J. Reprod. Dev.**, Tokyo, v.53, p.27-38, 2007.

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

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; BERTHELOT, V.; FROMENTIN, G.; HOCQUETTE, J.F.; MARTIGNAT, L.; RENARD, J.P. Assessing the quality of products from cloned cattle: an integrative approach. **Theriogenology**, v.67, p.134-141, 2007.



HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LeBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.66, p.6-13, 2002.

HEYMAN, Y.; RENARD, J.P. Cloning of domestic species. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.42, p.427-436, 1996.

HEYMAN, Y.; VIGNON, X.; RENARD, J.P. Manipulação e estocagem de linhagens celulares para clonagem somática em bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 15, Rio Quente, 2000. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.28 (Supl.), n.1, p.72-84, 2000.

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T.; SPENCER, T. E.; THOMPSON, J. A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.63, p.1787-1794, 2000.

HILL, J. R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, Stoneham, v.51, p.1451-1465, 1999.

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

HIRAO, Y.; EPPIG, J. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in the strain LT mouse oocyte: participation of MOS. **Development**, Cambridge, v.124, p.5107-5113, 1997.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. **Nature**, London, v. 415, p.1035–1038, 2002.

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

HOWLETT, S.K.; BARTON, S.C.; SURANI, M.A.H. Nuclear cytoplasmic interactions following nuclear transplantation in mouse embryos. **Development**, Cambridge, v.101, p.915–923, 1987.

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

IBÁÑEZ, E.; SANFINS, A.; COMBELLES, C.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTROM, E. W. Induced enucleation of mouse and goat oocytes: kinetic and phenotypic characterizations. **Theriogenology**, Stoneham, v.57, p.421, 2002.

ILLMENSEE, K.; HOPPE, P.C. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell**, Cambridge, v.23, p.9-18, 1981.

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

IWATA, H.; AKAMATSU, S.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. **Theriogenology**, Stoneham, v.50, p.365-375, 1998.

JOUNEAU, A.; RENARD, J.P. Reprogramming in nuclear transfer. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, London, v.13, p.486-491, 2003.

JULIAN, M.; TOLLON, Y.; LAJOIE-MAZENC, I.; MOISAND, A.; MAZARGUIL, H.; PUGET, A.; WRIGHT, M.  $\lambda$ -Tubulin participates in the formation of the midbody during cytokinesis in mammalian cells. **J. Cell Sci.**, London, v.105, p.145-156, 1993.

KANKA, J.; FULKA Jr, J.; FULKA, J.; PETR, J. Nuclear transplantation in bovine embryo: fine structural and autoradiographic studies. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.29, p.110-116, 1991.

KANKA, J.; SMITH, S. D.; SOLOY, E.; HOLM, P.; CALLESEN, H. Nucleolar ultrastructure in bovine nuclear transfer embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.52, p.253-263, 1999.

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

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

KATO, Y.; TANI, T.; TSUNODA, Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.120, p.231-237, 2000.

KIKUCHI, K.; NAITO, K.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A. ; KANEKO, H.; YAMASHITA, M.; AOKI, F.; TOJO, H.; TOYODA, Y. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.63, p.715-722, 2000.

KIM, N-H.; FUNAHASHI, H.; PRATHER, R.S.; SCHATTEN, G.; DAY, B.N. Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.43, p.248-255, 1996.

KIND, A.; COLMAN, A. Therapeutic cloning: needs and prospects. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, Oakland, v.10, p.279-286, 1999.

KING, W.A., COPPOLA, G., ALEXANDER, B., MASTROMONACO, G., PERRAULT, S., NINOSOTO, M.I., PINTON, A., JOUDREY, E.M., BETTS, D.H. The impact of chromosomal alteration on embryo development. **Theriogenology**, Stoneham, v.65, p.166-1772, 2006.

KISHIKAWA, H.; WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. Comparison of oocyte-activating agents for mouse cloning. **Cloning**, Larchmont New York, v.1., n.3, p.153-160, 1999.

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

KNOCKAERT, M.; GREENGARD, P.; MEIJER, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v.23, p.417-425, 2002.

KOCHHAR, H.P.S.; PEIPPO, J.; KING, W.A. Sex related embryo development. **Theriogenology**, v.55, p.3-14, 2001.

KRAGH, P. M.; DU, Y.; CORYDON, T. J.; PURUP, S.; BOLUND, L.; VAJTA, G. Efficient *in vitro* production of porcine blastocysts by handmade cloning with a combined electrical and chemical activation. **Theriogenology**, Stoneham, v.64, p.1536-1545, 2005.

KRUIP, T.A M.; BEVERS, M.M.; KEMP, B. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. **Theriogenology**, Stoneham, v.53, p.611-618, 2000.

KRUIP, T. A. M.; DEN DAAS, J. H. G. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology**, Stoneham, v.47, p.43-52, 1997.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes without influencing chromosome condensation activity. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 62, p.292-302, 2000.

KUBIAK, J. Z.; WEBER, M.; De PENNART, H.; WINSTON, J.; MARO, B. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. **EMBO J.**, Oxford, v.12, p.3773-3778, 1993.

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

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

LAN, G-C.; WU, Y-G.; HAN, D.; GE, L.; LIU, Y.; WANG, H-L.; WANG, J-Z.; TAN, J-H. Demecolcine-assisted enucleation of goat oocytes: protocol optimization, mechanism investigation, and application to improve the developmental potential of cloned embryos. **Cloning Stem Cells**, Larchmont New York, v.10, p.189-201, 2008.

LANGAN, T.A.; GAUTIER, J.; LOHKA, M.; HOLLINGSWORTH, R.; MORENO, P.N.; NURSE, P.N.; MALER, J.L.; SCLAFANI, R. Mammalian growth-associated HI histone kinase: a homolog of cdc2+/CDC28 protein kinase controlling mitotic entry in yeast and frog cells. **Mol. Cell Bio.**, Washington, v.9, p.3860, 1989.

LANZA, R.P.; CIBELLI, J.B.; WEST, M.D. Human therapeutic cloning. **Nat. Med.**, New York, v.5, p.975-977, 1999.

LARKIN, K.; DANILCHIK, M.V.; Microtubules are required for completion of cytokinesis in sea urchin eggs. **Dev. Biol.**, v.214, p. 215-226, 1999.

LATHAM, K. H. Epigenetic modification and imprinting of the mammalian genome during development. **Curr. Top. Dev. Biol.**, New York, v. 43, p. 1-49, 1999.

LATHAM, K.E.; GARRELS, J.I.; CHANG, C.; SOLTER, D. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. **Development**, Cambridge, v. 112, p. 921–932, 1991.

LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.67, p.767-775, 2002.

LEAL, C.L.V.; MÉO, S.C.; GARCIA, J.M. Activation of bovine oocytes by strontium combined or not with an electric pulse. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Belo Horizonte, v.55, n.3, p.371-373, 2003.

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

LEE, J., MIYANO, T., MOOR, R. M. Spindle formation and dynamics of  $\lambda$ -tubulin and nuclear mitotic apparatus protein distribution during meiosis in pig and mouse oocytes. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 62, p. 1184-1192, 2000.

LEE, J.T.; DAVIDOW, L.S.; WARSHAWSKY, D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. **Nat. Genet.** New York, v.21, p.400-404, 1999.

LEE, T.H.; SOLOMON, M.J. MUMBY, M.C.; KIRSCHNER, M.W. INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A. **Cell**, Cambridge, v.64, p.415–423, 1991.

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

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

LI, G-P.; WHITE, K.L.; ASTON, K.I.; BUNCH, T.D.; HICKS, B.; LIU, Y.; SESSIONS, B.R. Colcemid-treatment of heifer oocytes enhances nuclear transfer embryonic development, establishment of pregnancy and development to term. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 76, p.620-628, 2009.

LI, J.; DU, Y., ZHANG, Y.H. Chemically assisted handmade enucleation of porcine oocytes. **Cloning Stem Cells**, New York, v.8, p.241–250, 2006.

LIN, Y.M.; TENG, Y.N.; CHUNG, C.L.; TSAI, W.C.; LIN, Y.H.; LIN, J.S.N.; KUO, P.L. Decreased mRNA transcripts of M-phase promoting factor and its regulators in the testes of infertile men. **Human Reprod.**, Oxford, v. 21, p. 138–144, 2006.

LIU, J-L.; WANG, M-K. ; SUN, Q-Y. ; XU, Z. ; CHEN, D-Y. Effect of telophase enucleation on bovine somatic nuclear transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v.54, p.989-998, 2000.

LIU, L.; JU, J-C.; YANG, X. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.59, p.537-545, 1998.

LOI, P.; CLINTON, M.; VACKOVA, I.; FULKA Jr, J.; FEIL, R.; PALMIERI, C.; SALDA, L. D.; PTAK, G. Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. **Theriogenology**, Los Altos, v.65, p.1110-1121, 2006.

LOI, P.; LEDDA, S.; FULKA Jr.; CAPPAL, P.; MOOR, R.M. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.58, p.1177-1187, 1998.

LOI, P.; PTAK, G.; BARBONI, B.; FULKA Jr, J.; CAPPAL, P.; CLINTON, M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. **Nat. Biotechnol.**, New York, v.19, p.962-964, 2001.

LOPES, A.S.; WRENZYCKI, C.; RAMSING, N.B.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H.; LOVENDAHL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Respiration rates correlate with mRNA expression of *G6PD* and *GLUT1* genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. **Theriogenology**, Stoneham, v.68, p.223-236, 2007.

LORCA, T.; GALAS, S.; FESQUET, D.; DEVAULT, A.; CAVADORE, J.C. ; DORÉE, M. Degradation of the proto-oncogene product p39mos is not necessary for cyclin proteolysis and exit from meiotic metaphase: requirement for a  $Ca^{2+}$ -calmodulin dependent event. **EMBO J.**, Oxford, v.10, p.2087-2093, 1991.

LUCAS-HAHN, A.; HERRMANN, D.; LEMME, E.; KORSawe, K.; HADELER, K.G.; NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Sex-related expression on the two X chromosome specific transcripts (*G6PD*, *PGK*) and the X inactive-specific transcript (*XIST*) in bovine blastocysts. **Theriogenology**, Stoneham, v.55, p.412, 2001.

LUNDGREN, K.; WALWORTH, N.; BOOHER, R.; DEMBSKI, M.; KIRSCHNER, M.; BEACH, D. *mik1* and *wee1* cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of *cdc2*. **Cell**, Cambridge, v.64, p.1111–1122, 1991.

MASUI, Y. Towards understanding control of the division cycle in animal cells. **Biochem. Cell Biol.**, Ottawa, v.70, p.920-945, 1992.

MATSUZAKI ,M.; SHIGA, K. Endocrine characteristics of cloned calves. **Cloning Stem Cells**, New York, v.4, p.261-267, 2002.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microcirurgy and cell fusion. **Science**, Washington, v.220, p.1300-1302, 1983.

McGRAW, S.; ROBERT, C.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.A. Quantification of histone acetyltransferase transcripts in early bovine embryo development. **Biol. Reprod.**, Champaign, v 66, p.245, 2002.

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

MEIRELLES, F.V.; PROVIDELO, F.D.; PERECIN, F.; MERIGHE, G.K.F.; FERREIRA, C.R.; FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P.; MIRANDA, M.S.; CHIARATTI, M.R.; de BEM, T.H.C. Transferência de núcleo: potenciais aplicações no controle genético nuclear e citoplasmático. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.31, p.382-390, 2007.

MENG, L.; ELY, J. J.; STOUFFER, R. L.; WOLF, D. P. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 57, p. 454-459, 1997.

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

MÉO, S.C. ; YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C.R.; PERECIN, F.; SARAIVA, N.Z.; LEAL, C.L.; GARCIA, J.M. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using single and combined strontium and 6-dimethylaminopurine treatments. **Zygote**, Cambridge, v.15, p.295-306, 2007.

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

MERIGHE, G.K.F.; BIASE, F.H.; SANTOS-BIASE, W.K.F.; MIRANDA, M.S.; de BEM, T.H.C.; WATANABE, Y.F.; MEIRELLES, F.V. Gene silencing during development of *in vitro*-produced female bovine embryos. **Genet. Mol. Res.**, Ribeirao Preto, v.8, p.1116-1127, 2009.

MIGEON, B. R.; AXELMAN, J.; JEPPESEN, P. Differential X reactivation in human placental cells: implications for reversal of X inactivation. **Am. J. Hum. Genet.**, Baltimore, v.77, p.355-364, 2005.

MIYOSHI, K.; RZUCIDLO, S.J.; GIBBONS, J.R.; ARAT, S.; STICE, S.L. Development of porcine embryos reconstituted with somatic cells and enucleated metaphase I and II oocytes matured in a protein-free medium. **BMC Dev. Biol.**, London, v.1, p.12, 2001.

MIYOSHI, K.; RZUCIDLO, S.J.; PRATT, S.L. Utility of rapidly matured oocytes as recipients for production of cloned embryos from somatic cells in the pig. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.67, p.540–545, 2002.

MIYOSHI, K.; RZUCIDLO, S.J.; PRATT, S.L.; STICE, S.L. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.68, p.1079–1086, 2003.

MOHAMED NOUR, M. S.; TAKAHASHI, Y. Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p. 661-666, 1999.

MOTLIK, J.; SUTOVSKY, P.; KALOUS, J.; KUBELKA, M.; MOOS, J.; SCHULTZ, R.M. Co-culture with pig membrana granulosa cells modulates the activity of cdc2 and MAP kinase in maturing cattle oocytes. **Zygote**, Cambridge, v.4, p.247-256, 1996.

MUNSIE, M. Transgenic strategy for demonstrating nuclear reprogramming in the mouse. **Cloning Stem Cells**, Larchmont New York, v.4, p.121-130, 2002.

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

NICOL, C.J.; ZIELENSKI, J.; TSUI, L.C.; WELLS, P.G. An embryoprotective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. **FASEB J.** Bethesda, v.14, p.111-127, 2000.

NIEMANN, H.; RATH, D.; WRENZYCKI, C. Advances in biotechnology: newtools in future pig production for agriculture and biomedicine. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 38, p. 82–89, 2003.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, p. 31-34, 2000.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; BRAMBRINK, T.; KUES, W.A.; CARNWATH, J.W. Gene expression patterns in bovine *in vitro*-produced and nuclear transfer derived embryos and their implications for early development. **Cloning Stem Cells**, v. 4, p. 29-38, 2002.

NIXON, V.L.; LEVASSEUR, M.; McDOUGALL, A.; JONES, K.T. Ca(2+) oscillations promote APC/C-dependent cyclin B1 degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. **Curr. Biol.** London, v.12, 746–750, 2002.

NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. **Nature**, London, v.344, p.503-508, 1990.

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

OBACK, B.; WELLS, D. Donor cells for nuclear cloning: many are called, but few are chosen. **Cloning Stem Cells**, Larchmont New York v.4, p.147-168, 2002.



OGURA, A.; INOUE, K.; OGONUKI, N.; NOGUCHI, A.; TAKANO, K.; NAGANO, R.; SUZUKI, O.; LEE, J.; ISHINO, F.; MATSUDA, J. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.62, p.1579-1584, 2000.

OLIVEIRA, A.T.D.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* with different serum concentrations. **Reprod. Dom. Anim.**, Berlin, v.41, p.129-136, 2006.

O'NEILL, G.T.; KAUFMAN, M.H. Cytogenetic analysis of ethanol induced parthenogenesis. **J. Exp. Zool.**, New York, v.249, p.182-192, 1989.

ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; AKITA, T.; MIKAWA, S.; TAKEDA, K.; AWATA, T.; HANADA, H.; PERRY, A.C.F. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. **Science**, Washington, v.289, p.1188-1190, 2000.

OTAEGUI, P.J.; O'NEIL, G.T.; CAMPBELL, K.H.S.; WILMUT, I. Transfer of nuclei from 8-cell stage mouse embryos following use of nocodazole to control the cell cycle. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.39, p.147-152, 1994.

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

PACE, M.M.; AUGENSTEIN, M.L.; BATTHAUSER, J.M.; CHILDS, L.A.; EILERTSEN, K.J.; ENOS, J.M.; FORSBERG, E.J.; GOLUEKE, P.J.; GRABER, D.F.; KEMPER, J.C.; KOPPANG, R.W.; LANGE, G.; LESMEISTER, T.L.; MALLON, K.S.; MELL, G.D.; MISICA, P.M.; GENSKOW, M.P.; STRELCHENKO, N.S.; VOELKER, G.R.; WATT, S.R. Ontogeny of cloned cattle to lactation. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.67, p.334-339, 2002.

PATERSON, L.; DE SOUSA, P.; RITCHIE, W.; KING, T.; WILMUT, I. Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials applications of reproductive cloning. **Anim. Reprod Sci**, Amsterdam, v.79, p.137-143, 2003.

PEDERSEN, H. G.; SCHMIDT, M.; SANGILD, P. T.; STROBECH, L.; VAJTA, G.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Clinical experience with embryos produced by handmade cloning: work in progress. **Mol. Cell. Endocrinol.**, Amsterdam, v. 234, p. 137-143, 2005.

PEIPPO, J.; KURKILAHTI, M.; BREDBACKA, P. Developmental kinetics of *in vitro* produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. **Zygote**, Cambridge, v.9, p.105-113, 2001.

PERECIN, F.; MÉO, S.C.; YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C.R.; MERIGHE, G.K.F.; MEIRELLES, F.V.; GARCIA, J.M. Imprinted gene expression in *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos and chorio-allantoic membranes. **Genet. Mol. Res.**, Ribeirao Preto, v.8, p.76-85, 2009.

PEURA, T. T.; VAJTA, G. A comparison of established and new approaches in ovine and bovine nuclear transfer. **Cloning Stem Cells**, Larchmont New York, v.5, p.257-277, 2003.

PFÄFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.** London, v.30, p.36, 2002.

PIEDRAHITA, J.A. Targeted modification of the domestic animal genome. **Theriogenology**, Stoneham, v.53, p.105-116, 2000.

POLEJAEVA, I. A.; CHEN, S-H.; VAUGHT, T. D.; PAGE, R. L.; MULLINS, J.; BALL, S.; DAI, Y.; BOONE, J.; WALKER, S.; AYARES, D. L.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. S. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, London, v.407, p.505-509, 2000.

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

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

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

PRATHER, R.S.; SIMS, M.M.; FIRST, N.L. Nuclear transplantation in the pig embryo: Nuclear swelling. **J. Exp. Zool.**, New York, v.255, p.355-358, 1990.

PRATHER, R. S.; SIMS, M. M.; MAUL, G. G.; FIRST, N. L.; SCHATTEN, G. Nuclear laminin antigens are developmentally regulated during porcine and bovine early embryogenesis. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.41, p.123-132, 1989a.

PRESICCE, G.A.; YANG, X. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.38, p.380-385, 1994.

PTAK, G.; CLINTON, M.; TISCHNER, M. Improving delivery and offspring viability of in vitro-produced and cloned sheep embryos. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.67, p.1719-1725, 2002.

QIU, G.F.; RAMACHANDRA, K.; REXROAD III, C.E.; YAO, J. Molecular characterization and expression profiles of cyclin B1, B2 and Cdc2 kinase during oogenesis and spermatogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **An. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.105, p.209-225, 2008.

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

RAVELICH, S.R.; BREIER, B.H.; REDDY, S.; KEELAN, J.A.; WELLS, D.N.; PETERSON, A.J.; LEE, R.S.F. Insulin-like growth factor-I and binding proteins 1,2 and 3 in bovine nuclear transfer pregnancies. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.70, p.430-438, 2004a.

RAVELICH, S.R.; SHELLING, A.N.; RAMACHANDRAN, A.; REDDY, S.; KEELAN, J.A.; WELLS, D.N.; PETERSON, A.J.; LEE, R.S.; BREIER, B.H. Altered Placental Lactogen and Leptin Expression in Placentomes from Bovine Nuclear Transfer Pregnancies. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.71, p.1862-1869, 2004b.

RAVELICH, S.R.; SHELLING, A.N.; WELLS, D.N.; PETERSON, A.J.; LEE, R.S.F. Expression of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 and the receptors TGF- $\beta$ R1 and TGF- $\beta$ RII in placentomes of artificially inseminated and nuclear transfer derived bovine pregnancies. **Placenta**, London, v.27, p.307-316, 2006.

RAY, P.F.; WINSTON, R.M.; HANDYSIDE, A.H. XIST expression from the maternal X chromosome in human male preimplantation embryos at the blastocyst stage. **Hum. Mol. Genet.** Oxford, v.6, p.1323-1327, 1997.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, Washington, v.293, p.1089-1093, 2001.

RENARD, J.P.; CHASTANT, S.; CHESNÉ, P.; RICHARD, C.; MARCHAL, J.; CORDONNIER, N.; CHAVATTE, P.; VIGNON, X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. **Lancet**, London, v.353, p.1489-1491, 1999.

RENARD, J.P.; ZHOU, Q.; LEBOURHIS, D.; CHAVATTE-PALMER, P.; HUE, I.; HEYMAN, Y.; VIGNON, X. Nuclear transfer technologies: between successes and doubts. **Theriogenology**, Stoneham, v.57, p.203-222, 2002.

RIBEIRO, A.R.B.; ALENCAR, M.M.; IBELLI, A.M.G.; CARVALHO, F.M.; SOUZA, J.R.T.; REGITANO, L.C.A. Expressão de genes das proteínas de choque térmico em bovinos Nelore, Senepol x Nelore e Angus x Nelore após estresse térmico. In 55º Congresso Brasileiro de Genética, v.55, p.209, 2009.

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

RIEGER, D. Relationships between energy-metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v.37, p.75-93, 1992.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; ARROYO-GARCIA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIERREZ-ADAM, A. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.66, p.589-595, 2002.

ROBERT, C.; HUE, I.; MCGRAW, S. ; GAGNÉ, D. ; SIRARD, M-A. Quantification of Cyclin B1 and p34cdc2 in Bovine Cumulus-Oocyte Complexes and Expression Mapping of Genes Involved in the Cell Cycle by Complementary DNA Macroarrays. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.67, p.1456-1464, 2002.

ROBL, J.M. Development and application of technology for large scale cloning of cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v.51, p.499-508, 1999.

RODRIGUEZ-OSORIO, N.; WANG, Z.; KASINATHAN, P.; PAGE, G.P.; ROBL, J.M.; MEMILI, E. Transcriptional reprogramming of gene expression in bovine somatic cell chromatin transfer embryos. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 190, 2009.

RUDENKO, L.; MATHESON, J.C. The US FDA and animal cloning: risk and regulatory approach. **Theriogenology**, Stoneham, v.67, p.198-206, 2007.

SARAIVA, N.Z. **Efeitos da demecolcina na cinética de maturação, microtúbulos e na enucleação química de oócitos bovinos**. 2006. 93f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SARAIVA, N.Z.; PERECIN, F.; MÉO, S.C.; FERREIRA, C.R.; TETZNER, T.A.D.; GARCIA, J.M. Demecolcine effects on microtubule kinetics and on chemically assisted enucleation of bovine oocytes. **Cloning Stem Cells**, Larchmont New York, v.11, p.141-151, 2009.

SAVARD, C.; NOVAK, S.; SAINT-CYR, A.; MOREAU, M.; POTHIER, F.; SIRARD, M-A. Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.67, p.70-76, 2004.

SEIDEL, G.E. Jr.; SCHENK, J.L.; HERICKHOFF, L.A., DOYLE, S.P., BRINK, Z.; GREEN, R.D.; CRAN, D.G. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v.52, p.1407-20, 1999.

SENDA, S.; WAKAYAMA, T.; YAMAZAKI, Y.; OHGANE, J.; HATTORI, N.; TANAKA, S.; YANAGIMACHI, R.; SHIOTA, K. Skewed X-inactivation in cloned mice. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, New York, v.321, p.38-44, 2004.

SHI, W.; ZAKHARTCHENKO, V.; WOLF, E. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. **Differentiation**, London, v.71, p.91-113, 2003.

SHIN, T.; KRAEMER, D.; PRYOR, J.; LIU, L.; RUGILA, J.; HOWE, L.; BUCK, S.; MURPHY, K.; LYONS, L.; WESTHUSIN, M. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**, London, v.415, p.859, 2002.

SIMERLY, C.; DOMINKO, T.; NAVARA, C.; PAYNE, C.; CAPUANO, S.; GOSMAN, G.; CHONG, K.Y.; TAKAHASHI, D.; CHACE, C.; COMPTON, D.; HEWITSON, L.; SCHATTEN, G. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. **Science**, Washington, v.300, p.297, 2003.

SIMERLY, C.; NAVARA, C.; HYUN, S.H.; LEE, B.C.; KANG, S.K.; CAPUANO, S.; GOSMAN, G.; DOMINKO, T.; CHONG, K.Y.; COMPTON, D.; HWANG, W.S.; SCHATTEN, G. Embryogenesis and blastocyst development after somatic cell nuclear transfer in nonhuman primates: overcoming defects caused by meiotic spindle extraction. **Dev. Biol.**, New York, v.276, p.237-252, 2004.

SMITH, L.C.; BORDIGNON, V.; BABKINE, M.; FECTEAU, G.; KEEFER, C. Benefits and problems with cloning animals. **Can. Vet. J.**, Guelph, v.41, p.919-924, 2000.

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

SMITH, L.C.; MURPHY, B.D. Genetic and epigenetic aspects of cloning and potential effects on offspring of cloned mammals. **Cloning Stem Cells**, Larchmont New York, v.6, p.126-132, 2004.

SMITH, R.C.; DWORKIN-RASTL, E.; DWORKIN, M.B. Expression of histone H1-like protein is restricted to early *Xenopus* development. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, NY, v.2, p.1284-1295, 1988.

SOLOY, E.; SRSEN, V.; PAVLOK, A.; HYTTEL, P.; THOMSEN, P.D.; SMITH, S.D.; PROCHÁZKA, R.; KUBELKA, M.; HOIER, R.; BOOTH, P.; MOTLIK, J.; GREVE, T.

Establishment of the block against sperm penetration in parthenogenetically activated bovine oocytes matured *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.111, p.151-157, 1997.  
SPEEMANN, H. **Embryonic Development and Induction**. New Haven: Yale University Press, Conn., 1938.

STICE, S.L.; ROBL, J.M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.39, p.657-664, 1988.

SULLIVAN, E. J.; KASINATHAN, S.; KASINATHAN, P.; ROBL, J. M.; COLLAS, P. Cloned calves from chromatin remodeled *in vitro*. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.70, p.146-153, 2004.

SUN, Q.Y.; LAI, L.X.; PARK, K.W.; DAY, B.N.; KUHHLER, B.; PRATHER, R.S.; SCHATTEN, H. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.64, p.879-889, 2001a.

SUN, Q.Y.; LAI, L.; PARK, K.W.; WU, G-M.; BONK, A.; CABOT, R.; PARK, K.W.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S.; SCHATTEN, H. Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation, Microtubule Organization, Chromatin Behavior, and Cell Cycle Progression by Protein Phosphatases During Pig Oocyte Maturation and Fertilization *In Vitro*. **Biol Reprod.**, Champaign, v.66, p.580-588, 2002.

SUN, Q. Y.; WU, G. M.; LAI, L.; PARK, K. W.; CABOT, R.; CHEONG, H. T. DAY, B. N.; PRATHER, R. S.; SCHATTEN, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. **Reproduction**, Cambridge, v.122, p.155-163, 2001b.

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

SZOLLOSI, D.; CZOLOWSKA, R.; SZOLLOSI, M.S.; TARKOWSKI, A.K. Remodeling of mouse thymocyte nuclei depends on the time of their transfer into activated, homologous oocytes. **J. Cell Sci.**, London, v. 91, p. 603-613, 1988.

TAKAGI, N.; ABE, K. Detrimental effects of two active chromosomes on early mouse development. **Development**, Cambridge, v.109, p.189-201, 1990.

TAKAGI, N. Imprinted X-chromosome inactivation: enlightenment from embryos *in vivo*. **Seminars in Cell Development Biology**, v.14, p.319-329, 2003.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, Cambridge, v.126, p.663-676, 2006.

TAKAHASHI, S.; ITO, Y. Evaluation of meat products from cloned cattle: biological and biochemical properties. **Cloning Stem Cells**, Larchmont New York, v.6, p.165-171, 2004.

TALMOR-COHEN, A.; ELIYAHU, E.; SHALGI, R. Signalling in mammalian egg activation: role of protein kinases. **Mol. Cell Endocrinol.**, Amsterdam, v.187, p.145-149, 2002.

TAMASHIRO, K.L.; WAKAYAMA, T.; AKUTSU, H.; YAMAZAKI, Y.; LACHEY, J.L.; WORTMAN, M.D.; SEELEY, R.J.; D'ALESSIO, D.A.; WOODS, S.C.; YANAGIMACHI, R.; SAKAI, R.R. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. **Nat. Med.**, New York, v.8, p.262-267, 2002.

TAMASHIRO, K.L.; WAKAYAMA, T.; BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; YANAGIMACHI, R. Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.62, p.1579-1584, 2000.

TANAKA, H.; KANAGAWA, H. Influence of combined activation treatments on the success of bovine nuclear transfer using young or aged oocytes. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.49, p.113-123, 1997.

TANI, T.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Reprogramming of bovine somatic cell nuclei is not directly regulated by maturation promoting factor or mitogen-activated protein kinase activity. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.69, p.1890-1894, 2003.

TANI, T.; SHIMADA, H.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Demecolcine-assisted enucleation for bovine cloning. **Cloning Stem Cells**, Larchmont New York, v.8, p.61-66, 2006.

TANI, T.; TSUNODA, Y. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.64, p.324-330, 2001.

TATHAM, B.G.; DOWSING, A.T.; TROUNSON, A.O. Enucleation by centrifugation of *in vitro*-matured bovine oocytes for use in nuclear transfer. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.53, p.1088-1094, 1995.

TECIRLIOGLU, R. T.; FRENCH, A. J.; LEWIS, I. M.; VAJTA, G.; KORFIATIS, N. A.; HALL, V. J.; RUDDOCK, N. T.; COONEY, M. A.; TROUNSON, A. O. Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v.15, p.361-366, 2003.

- TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.26, p.90-100, 1990.
- THOMPSON, J.G. Defining the requirements for bovine embryo culture. **Theriogenology**, Stoneham, v.45, p.27-40, 1996.
- THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.60-61, p.263-275, 2000.
- THOMPSON, J.G.E.; SIMPSON, A.C.; PUGH, P.A.; DONNELLY, P.E.; TERVIT, H.R. Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. **J. Reprod. Fert.**, Cambridge, v.89, p.573-578, 1990.
- TIAN, X.C.; KUBOTA, C.; SAKASHITA, K.; IZAIKE, Y.; OKANO, R.; TABARA, N.; CURCHOE, C.; JACOB, L.; ZHANG, Y.; SMITH, S.; BORMANN, C.; XU, J.; SATO, M.; ANDREW, S.; YANG, X. Meat and milk composition of bovine clones. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v.102, p.6261-6266, 2005.
- TIAN, X.C.; LONERGAN, P.; JEONG, B-S.; EVANS, A.C.O.; YANG, X. Association of MPF, MAPK, and nuclear progression dynamics during activation of young and aged bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.62, p.132-138, 2002.
- VAN VLECK, L.D. Implications of cloning for breed improvement strategies. Are traditional methods of animal improvement obsolete? **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.77, p.111-121, 1998.
- VAN THUAN, N.; WAKAYAMA, S.; KISHIGAMI, S.; WAKAYAMA, T. Donor centrosome regulation of initial spindle formation in mouse somatic cell nuclear transfer: roles of gamma-tubulin and nuclear mitotic apparatus protein 1. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.74, p.777-787, 2006.
- VAJTA, G.; BARTELS, P.; JOUBERT, J.; DE LA REY, M.; TREADWELL, R.; CALLESEN, H. Production of a healthy calf by somatic cell nuclear transfer without micromanipulators and carbon dioxide incubators using the handmade cloning (HMC) and submarine incubation system (SIS). **Theriogenology**, Stoneham, v.62, p.1465-1472, 2004.
- VAJTA, G.; LEWIS, I. M.; HYTTEL, P.; THOUAS, G. A.; TROUNSON, A. O. Somatic cell cloning without micromanipulators. **Cloning**, Larchmont New York, v.3, p.89-95, 2001.
- VAJTA, G.; LEWIS, I. M.; TROUNSON, A. O.; PURUP, S.; MADDOX-HYTTEL, P.; SCHMIDT, M.; PEDERSEN, H.G.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.68, p.571-578, 2003.



VERDE, F.; DOGTEROM, M.; STELZER, E.; KARSENTI, E.; LEIBLER, S. Control of microtubule dynamics and length by cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. **J. Cell Biol.**, New York, v.118, p.1097-1108, 1992.

VERDE, F.; LABBE, J.C.; DORREE, M.; KARSENTI, E. Regulation of microtubule dynamics by cdc2 kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. **Nature**, London, v.343, p.233-8, 1990.

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

VERLHAC, M.H.; PENNART, H.; MARO, B.; COBB, M.H.; CLARKE, H.J. MAP Kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. **Dev. Biol.**, San Diego, v.158, p.330-340, 1993.

VIREQUE, A.A.; CAMARGO, L.S.A.; SERAPIÃO, R.V.; ROSA e SILVA, A.A.M.; WATANABE, Y.F.; FERREIRA, E.M.; NAVARRO, P.A.A.S.; MARTINS, W.P.; FERRIANI, R.A. Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. **Theriogenology**, Stoneham, v.71, p.620-627, 2009.

WAGONER, E. J.; ROSENKRANS, C. F.; GLIEDT, D. W.; PIERSON, J. N.; MUNYON, A. L. Functional enucleation of bovine oocytes: effects of centrifugation and ultraviolet light. **Theriogenology**, Stoneham, v.46, p.279-284, 1996.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C. F.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, London, v.394, p.369-374, 1998.

WAKAYAMA, T.; RODRIGUEZ, I.; PERRY, A.C.F.; YANAGIMACHI, R.; MOMBAERTS, P. Mice cloned from embryonic stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.96, p.14984-14989, 1999.

WAKAYAMA, T.; SHINKAI, Y.; TAMASHIRO, K.L.; YANAGIMACHI, R. Cloning of mice to six generations. **Nature**, London, v.407, p.318-319, 2000.

WAKAYAMA, T.; TABAR, V.; RODRIGUEZ, I.; PERRY, A.C.; STUDER, L.; MOMBAERTS, P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. **Science**, Washington, v.292, p. 740-743, 2001.

WANG, W-H.; ABEYDEERA, L. R.; PRATHER, R. S.; DAY, B. N. Polymerization of nonfilamentous actin into microfilaments is an important process for porcine oocyte

maturation and early embryo development. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.62, p.1177-1183, 2000.

WARZYCH, E.; WRENZYCKI, C.; PEIPPO, J.; LECHNIAK, D. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro, **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.74, p.280–289, 2007.

WELLS, D. N. Animal cloning: problems and prospects. **Rev. Sci. Tech.**, Paris, v.24, p.251-256, 2005.

WELLS, D.N.; FORSYTH, J.T.; McMILLAN, V.; OBACK, B. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. **Cloning Stem Cells**, Larchmont New York, v.6, p.101-110, 2004.

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

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

WESTHUSIN, M. E.; LONG, C. R.; SHIN, T.; HILL, J. R.; LOONEY, C. R.; PRYOR, J. H.; PIEDRAHITA, J. A. Cloning to reproduce desired genotypes. **Theriogenology**, Stoneham, v.55, p.35-49, 2001.

WHITE, K.L.; BUNCH, T.D.; MITALIPOV, S.; REED, W.A. Establishment of pregnancy after transfer of nuclear transfer embryos produced from fusion of Argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. **Cloning**, Larchmont New York, v.1, p.47-54, 1999.

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

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

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

WILSON, J. M.; WILLIAMS, J. D.; BONDIOLI, K. R.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; McCALLA, D. F. Comparison of birthweight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.38, p.73-83, 1995.

WINSTON, N. J.; McGUINNESS, O.; JOHNSON, M. H.; MARO, B. The exit of mouse oocytes from meiotic M-phase requires an intact spindle during intracellular calcium release. **J. Cell Sci.**, London, v.108, p.143-151, 1995.

WITTMANN, T.; HYMAN, A.; DESAI, A. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. **Nat. Cell Biol.**, London, v.3, p.28-34, 2001.

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

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.53, p.8-18, 1999.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS Jr, A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Hum. Reprod.**, v. 16, p.893-901, 2001a.

WRENZYCKI, C.; HERMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSAWE, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development, **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v.17, p.23–35, 2005.

WRENZYCKI, C.; LUCAS-HALM, A.; HERRMANN, D.; LEME, E.; KORSAWE, K.; NIEMANN, H. *In Vitro* production and nuclear affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 66, p. 127-134, 2002.

WRENZYCKI, C., NIEMANN, H. Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of *in vitro* production and somatic nuclear transfer. **Reprod. Biomed.**, Cambridge, v.7, p.649-656, 2003.

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

XUE, F.; TIAN, X.C.; DU, F.; KUBOTA, C.; TANEJA, M.; DINNYES, A.; DAI, Y.; LEVINE, H.; PEREIRA, L.V.; YANG, X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. **Nat. Genet.**, New York, v.31, p.216-220, 2002.

YAMASHITA, M.; MITA, K.; YOSHIDA, N.; KONDO, T. Molecular mechanisms of the initiation of oocyte maturation: general and species-specific aspects. **Prog. Cell Cycle Res.**, New York, v.4, p.115–129, 2000.

YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C. R.; MÉO, S. C.; LEAL, C. L. V.; MEIRELLES, F. V. GARCIA, J. M. Use of strontium in the activation of bovine oocytes reconstructed by somatic nuclear transfer. **Zygote**, Cambridge, v.13, p.295-302, 2005.

YANAGIMACHI, R. Cloning: experience from the mouse and other animals. **Mol. Cell Endocrinol.**, Amsterdam, v.187, p.241-248, 2002.

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

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

YIN, X.J.; LEE, H.S.; LEE, Y.H.; SEO, Y.I.; JEON, S.J.; CHOI, E.G., CHO, S.J.; CHO, S.G.; MIN, W.; KANG, S.K.; HWANG, W.S.; KONG, I.K. Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. **Reproduction**, Cambridge, v.129, p.245-249, 2005.

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

YONG, Z.; YUQIANG, L. Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: production of goats by serially cloning embryos. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.58, p.266-269, 1998.

YOUNG, L. E.; FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, Stoneham, v.53, p.627-648, 2000.

ZERNICCKA-GOETZ, M.; MARO, B. Okadaic acid affects spindle organization in metaphase II-arrested oocytes. **Exp. Cell Res.**, New York, v.207, p.189–193, 1993.

ZHOU, Q.; RENARD, J.P.; LE FRIEC, G.; BROCHARD, V.; BEAUJEAN, N.; CHERIFI, Y.; FRAICHARD, A.; COZZI, J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. **Science**, Washington, v.302, p.1179, 2003.

ZIMMERMANN, U.; VIENKEN, J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. **J. Membr. Biol.**, New York, v.67, p.165-182, 1982.

ZOU, X.; CHEN, Y.; WANG ,Y.; LUO, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, X.; YANG, Y.; JU, H.; HEN, Y.; LAO, W.; XU, S.; DU, M. Production of cloned goats from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei or fused with cumulus cells. **Cloning**, Larchmont New York, v.3, p.31-37, 2001.