

**UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
TOCHIMARA APARECIDA MIYAUCHI**

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO PRÉ-IMPLANTACIONAL DE
EMBRIÕES BOVINOS PARTENOGENÉTICOS OU FECUNDADOS *IN VITRO***

**ALFENAS – MG
2012**

**UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
TOCHIMARA APARECIDA MIYAUCHI**

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO PRÉ-IMPLANTACIONAL DE
EMBRIÕES BOVINOS PARTENOGENÉTICOS OU FECUNDADOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

**ALFENAS – MG
2012**

Miyauchi, Tochimara Aparecida
Aspectos biológicos do desenvolvimento pré-
implantacional de embriões bovinos
partenogênicos ou fecundados in vitro/.—
Tochimara Aparecida Miyauchi.-- Alfenas, 2012.
90 f.
Orientador : Prof. Dr Luiz Sérgio de Almeida
Camargo
Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) –
Universidade José do Rosário Vellano.
1.Partogênese 2.Expressão gênica 3. Embrião 4.
Bovino I. Título
CDU: 611.013:636.2(043)

TOCHIMARA APARECIDA MIYAUCHI

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO PRÉ-IMPLANTACIONAL DE
EMBRIÕES BOVINOS PARTENOGENÉTICOS OU FECUNDADOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano, como parte das exigências do Mestrado em Medicina Veterinária para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada em 28 de setembro de 2012.

Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Universidade José do Rosário Vellano

Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes
Universidade José do Rosário Vellano

Dr. Eduardo Kenji Nunes Arashiro

DEDICATÓRIA

A minha família, meus pais Tochio e Lucimara, minha irmã Tatinha, minha vó Ada e meu tio Dinga, por acreditarem nos meus sonhos, NUNCA me desestimularam, SEMPRE me apoiaram. Sem o amor de vocês, com certeza, nada teria sido possível.

Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

A, Deus pela vida, inteligência e pela capacidade de chegar onde estou.

Aos meus pais, Tochio e Lucimara pelo amor, força e apoio incondicional.

A minha irmã e melhor amiga Tatimara, pelo incentivo e encorajamento nos momentos difíceis, sem você nada disso seria possível.

À minha querida vó Geralda (vó Ada), por estar sempre orando por mim.

Ao meu tio Mitsuo (Dinga), por ter facilitado minha estada em Juiz de Fora.

Ao meu namorado Thiago, que me apoiou, incentivou e compreendeu minha ausência nesses doze meses. A distância só fez aproximar ainda mais nossos corações.

A toda a minha família, principalmente minha madrinha Creusa, que esteve sempre me dando forças para seguir em frente. Considero-me uma pessoa privilegiada por ter vocês sempre ao meu lado.

Ao Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, pela amizade, pela confiança e pela oportunidade.

A todos da Biotran, pela amizade e pelo aprendizado.

À Dra. Marilu Martins Gioso, pela amizade, pelo incentivo e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, pelos ensinamentos, pela paciência, pela dedicação e pela oportunidade de realizar meu experimento junto a Embrapa.

À Dra. Lílian Tamy Iguma, pela amizade, pela colaboração e pelos ensinamentos.

Aos amigos da Embrapa Gado de Leite, Ana Clara e Eliza (em especial), Gabriela, João Vítor, Natana, Rafael, Savana, Thamiris, Dudu, Amanda e Fernanda, pelo auxílio nas atividades laboratoriais.

Aos também amigos da Embrapa Gado de Leite, Carolina, Michele (em especial), Sabine, Bruno, Myro e Arashiro, pelos ensinamentos.

Ao Joel, pelos ensinamentos e pela disponibilidade em coletar os ovários.

Ao pessoal do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, Daniele, Karina, Bel e Carol, pela colaboração.

À Embrapa Gado de Leite, por possibilitar a realização do experimento.

Aos colegas de mestrado, pela amizade, pelo companheirismo e pelos bons momentos de estudos e de aprendizado.

Aos professores do mestrado, pelos ensinamentos, pela doação, pela paciência e pelas críticas que me foram de grande valia em minha evolução.

Ao matadouro Fri Pai de Juiz de Fora, pela doação dos ovários.

À Universidade José do Rosário Vellano e a CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

À banca examinadora pela disponibilidade.

A todos que me incentivaram e torceram por mim, essa vitória é nossa.

A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

MIYAUCHI, Tochimara Aparecida. **Aspectos biológicos do desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos partenogenéticos ou fecundados *in vitro***. 2012. 92f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Unifenas, Alfenas, 2012.

A partenogênese tem sido descrita como um método alternativo para produzir embriões para estudos com células embrionárias, principalmente em humanos para os quais existe a restrição do uso de embriões fecundados. Procedimentos utilizados na partenogênese são também necessários para se produzir embriões por transferência nuclear com células somáticas nas espécies domésticas. Contudo, muitos aspectos biológicos, celulares e moleculares dos embriões partenogenéticos ainda são desconhecidos. Este estudo objetivou comparar a cinética do desenvolvimento, índice de apoptose e expressão de genes de estresse e metabolismo celular em embriões bovinos partenogenéticos e embriões fecundados *in vitro*. Oócitos (n=1541) obtidos de ovários de matadouro foram maturados *in vitro* e submetidos à ativação partenogenética (4,62 μ M ionomicina por 5 min seguido de 2 mM 6-DMAP por 4h) ou fecundação *in vitro* (2 x 10⁶ espermatozoides/ml por 20h, com sêmen de uma única partida). Com 72h pós-ativação/fecundação (hpaf) parte dos embriões (8 células) foram congelados para posterior análise da expressão gênica e outra parte foi separada em grupos de alto ou baixo potencial de desenvolvimento: Part \geq 8 - embriões partenogenéticos com 8 ou mais células (alto potencial de desenvolvimento); Part<8 - embriões com menos de 8 células (baixo potencial de desenvolvimento); FIV \geq 8 - embriões fecundados *in vitro* com 8 ou mais células; e FIV<8: embriões com menos de 8 células. Os embriões foram cultivados em meio CR2aa com 2,5% SFB em 5%CO₂, 5%O₂, 90% N₂ a 38,5°C e avaliadas as taxas de blastocistos com 168hpaf (D7) e 196hpaf (D8). Embriões com 8 células obtidos após 72hpfa foram analisados quanto à expressão gênica. Blastocistos em D8 foram fixados e posteriormente foram avaliados pela técnica de TUNEL o índice apoptótico. Os dados foram comparados por análise de variância e as médias por teste de Student Newman Keuls. A expressão gênica foi avaliada pelo *software* REST®. Os valores são mostrados como média \pm erro padrão. Embriões com 8 ou mais células produziram maiores (P<0,01) taxas de blastocistos no D7 e D8 do que os embriões com menos de oitos células mostrando seu maior potencial de desenvolvimento, independentemente se foram partenogenéticos ou fecundados. Embriões do grupo Part \geq 8 apresentaram maior (P<0,05) taxa de blastocistos no D7 (63,6 \pm 3,4%) que os FIV \geq 8 (45,3 \pm 8,9%), porém a taxa no D8 foi semelhante (56,7 \pm 3,0% e 44,2 \pm 8,9% para Part \geq 8 e FIV \geq 8, respectivamente; (P<0,05). Não houve diferença (P<0,05) quanto às taxas de blastocistos no D7 e D8 entre embriões com menos de 8 células oriundos da partenogênese ou fecundação. Não houve diferença quanto ao número total de células (92,0 \pm 3,4; 102,30 \pm 4,8), células apoptóticas (10,8 \pm 1,22; 9,5 \pm 1,07) e índice apoptótico (11,4 \pm 1,27; 9,8 \pm 1,8) nos blastocistos partenogenéticos e FIV, respectivamente. Nos embriões com 8 células analisados, houve subexpressão dos genes DNAJB1, HSPA1L, HSF1, GLUT1 nos Part em relação aos FIV, enquanto o HSF2 esteve sobreexpresso nos Part quando comparado aos FIV. Conclui-se que embriões partenogenéticos bovinos possuem

diferenças se comparados aos embriões fecundados *in vitro* quanto à capacidade de desenvolvimento pré-implantacional *in vitro* e expressão gênica, o que pode limitar o uso da partenogênese em estudos sobre desenvolvimento embrionário.

Palavras- chave: Partenogênese; expressão gênica; embrião; bovino.

ABSTRACT

MIYAUCHI, Tochimara Aparecida. **Biological aspects of preimplantation development of parthenogenetic or fertilized in vitro bovine embryos.** 2012. 92f. Dissertation (Master of Veterinary Medicine) - Unifenas, Alfenas, 2012.

Parthenogenesis has been described as an alternative method to produce embryos for studies with embryonic cells, particularly in humans which have a restriction of fertilized embryos. Procedures used in parthenogenesis are also required to produce embryos by somatic cell nuclear transfer in domestic species. However, many biological, cellular and molecular aspects of parthenogenetic embryos are still unknown. This study aimed to compare the kinetics of development, apoptosis rate and gene expression of stress and cellular metabolism in bovine parthenogenetic embryos and embryos fertilized *in vitro*. Oocytes (n = 1541) obtained from slaughterhouse ovaries were matured *in vitro* and submitted to parthenogenetic activation (4.62 μ M ionomycin for 5 min followed by 2 mM 6-DMAP for 4 h) or *in vitro* fertilization (2×10^6 sperm/mL for 20h with semen from a single departure). 72h postactivation/fertilization (hpaf), embryos (8-cell) were frozen for subsequent analysis of gene expression and another part has been separated into groups of high or low potential of development: Part ≥ 8 - parthenogenetic embryos with 8 or more cells (high development potential); Part < 8 - embryos less than 8 cells (low development potential); ≥ 8 IVF - *in vitro* fertilized embryos with 8 or more cells; and IVF < 8 - embryos with less than 8 cells. Embryos were cultured in CR2aa medium with 2.5% BFS in 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ at 38.5° C and were evaluated rates of blastocyst 168hpaf (D7) and 196hpaf (D8). 8-cell embryos obtained after 72hpfa were analyzed for gene expression. D8 blastocysts were fixed and subsequently apoptotic index was analyzed by TUNEL. Data were compared by analysis of variance and means by Student Newman Keuls test. Gene expression was evaluated by REST[®] software. Values are shown as mean \pm standard error. Embryos with 8 or more cells produced higher (P < 0.01) blastocysts rates in D7 and D8 compared to embryos with less than eight cells, showing its greatest development potential, regardless if they were parthenogenetic or fertilized. Embryos of Part ≥ 8 group had higher (P < 0.05) blastocyst rate in D7 (63.6 \pm 3.4%) than IVF ≥ 8 (45.3 \pm 8.9%), but at D8 rate was similar (56.7 \pm 3.0% and 44.2 \pm 8.9% for Part ≥ 8 and IVF ≥ 8 , respectively; P < 0.05). There was no difference (P < 0.05) on blastocyst rates at D7 and D8 between embryos with less than 8 cells derived from parthenogenesis or fertilization. There was no difference in total cell number (92.0 \pm 3.4, 102.30 \pm 4.8), apoptotic cells (10.8 \pm 1.22, 9.5 \pm 1.07) and apoptotic index (11.4 \pm 1.27, 9.8 \pm 1.8) for parthenogenetic and IVF blastocysts, respectively. In 8-cell embryos analyzed, there was a subexpression of genes DNAJB1, HSPA1L, HSF1 and GLUT1 for Part in relation to FIV, while HSF2 was overexpressed in Part compared to FIV. In conclusion, bovine parthenogenetic embryos differ to embryos fertilized *in vitro* in ability of preimplantation development *in vitro* and gene expression, which may limit the use of parthenogenesis in studies of embryonic development.

Keywords: Parthenogenesis, gene expression, embryo, bovine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organograma mostrando os grupos (partenogênese e fecundação <i>in vitro</i>) e os tratamentos experimentais.	528
Figura 2. Blastocistos (BI) produzidos por FIV ou Part no D7.	652
Figura 3. Imagens ilustrativas da detecção da fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL sob aumento de 1000X em blastocistos bovinos oriundos de fecundação <i>in vitro</i> (FIV) ou partenogênese (Part). As ilustrações FIV 1 e Part 1 são de blastocistos com blastômeros marcados pelo DAPI e visualizados em azul no filtro 460 nm. As ilustrações FIV 2 e Part 2 são de blastocistos com blastômeros corados pela fluoresceína visualizados em coloração verde no filtro 520±20 nm, indicando apoptose	663
Figura 4. Curvas de dissociação do gene B ACTINA obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part respectivamente.	90
Figura 5. Curvas de dissociação do gene <i>DNAJB1</i> obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part respectivamente.	90
Figura 6. Curvas de dissociação do gene <i>HSPA1L</i> obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part respectivamente.	90
Figura 7. Curvas de dissociação do gene <i>HSP1</i> obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part respectivamente.	91
Figura 8. Curvas de dissociação do gene <i>HSF2</i> obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part respectivamente.	91
Figura 9. Curvas de dissociação do gene <i>HSP27P1</i> obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part respectivamente.	91
Figura 10. Curvas de dissociação do gene <i>GLUT1</i> obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part respectivamente.	92
Figura 11. Quantificação de transcritos em embriões de 8 células produzidos por FIV ou Part. Colunas com asteriscos diferem dentro do mesmo gene ($P<0,05$).	69
Figura 12. Gel de agarose para verificação dos tamanhos dos fragmentos dos genes acima relacionados. Os marcadores (PM) utilizados foram de 50 pb. Os tratamentos visualizados foram F (FIV) e P (Part) respectivamente. Foram realizadas duplicatas e	

um controle negativo para cada gene. O número de pares de base de cada gene pode ser visualizado no quadro 1.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios da concentração e pureza da amostra (embriões de 8 células) dos grupos FIV e Part.	56
Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos específicos utilizados para o estudo dos genes em embriões bovinos, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no GenBank ou referência bibliográfica	57
Tabela 3. Concentração de <i>primers</i> , temperatura de pareamento e temperatura de dissociação dos genes estudados nas condições padronizadas da PCR em tempo real.	58
Tabela 4. Eficiência média das amplificações obtidas por PCR em tempo real nas comparações entre os grupos FIV e Part com embriões de 8 células para cada gene utilizado para análise da expressão relativa.....	59
Tabela 5. Efeito da fecundação <i>in vitro</i> (FIV) e da partenogênese (Part) sobre a clivagem de zigotos bovinos nas primeiras 72h após a ativação.	62
Tabela 6. Produção de blastocistos fecundados <i>in vitro</i> (FIV) ou partenogenéticos (Part) a partir de embriões com menos de 8 células (< 8cel) ou 8 células ou mais (≥8cel).	64
Tabela 7. Número total de células, de células apoptóticas e índice de apoptose em blastocistos produzidos por fecundação <i>in vitro</i> (FIV) ou partenogênese (Part) a partir de embriões com 8 ou mais células no D8.....	674

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGE – Ativação Genoma Embrionário
- AMPc – Adenosina monofosfato cíclica
- AP – Ativação Partenogenética
- CCOs – Complexos *Cumulus* Oócitos
- cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
- CIV – Cultivo *in vitro*
- DMAP – Dimetilaminopurine
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DPBS - Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
- ERK – Extracelular signal-regulated kinase
- FIV – Fecundação *in vitro*
- GAP – Comunicações intercelulares via junção
- GVBD – Quebra da vesícula germinativa
- HSE – Elemento do choque térmico
- HSF – Fator do choque térmico
- HSPs – Proteína do choque térmico
- ICM – Massa celular interna
- ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozoide
- MPF – Fator promotor de maturação
- MAPK – Proteína cinase ativada por mitógenos
- MEK – Proteína cinase ativada por mitógenos
- M I – Metáfase I
- M II – Metáfase II
- MIV – Maturação *in vitro*

- mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
- MZT – Transição materno zigótica
- OMI – Inibidor da maturação do oócito
- PCR – Reação em cadeia de polimerase
- PIVE – Produção *in vitro* de embriões
- RLT – Tampão de lise do *kit* Qiagen
- RNA – Ácido ribonucleico
- SFB – Soro fetal bovino
- RPE – Tampão de lavagem do *kit* Qiagen
- Talp – Tyrode-albumina lactato- piruvato
- Talp Hepes – Modified tyrodis solution
- TCM – Tissue culture médium
- TNCS – Transferência nuclear de células somáticas
- TRA – Técnica de reprodução assistida
- TUNEL – Deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end labeling assay
- VG – Vesícula germinativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE)	22
2.2 Partenogênese	25
2.2.1 Ativação partenogenética (AP).....	26
2.2.2 Agentes ativadores.....	27
2.3 Etapas da PIVE	28
2.3.1 Maturação do oócito	28
2.3.2 Maturação nuclear.....	30
2.3.3 Maturação citoplasmática.....	30
2.3.4 Maturação molecular	31
2.3.4.1 Fator promotor de maturação (MPF).....	31
2.3.4.2 Proteína cinase ativada por mitógenos (MAPKs)	32
2.3.4.3 Monofosfato de Adenosina cíclica (AMPC)	32
2.3.4.4 Inibidor de maturação oocitária (OMI)	32
2.3.4.5 Íons cálcio	33
2.4 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	33
2.5 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) e desenvolvimento embrionário	35
2.6 Transição materno zigótica (MZT).....	38
2.7 Proteínas associadas à resposta ao estresse	39
2.7.1 Proteínas do choque térmico (“Heat shock proteins” HSP)	39
2.7.2 Heat shock factors - HSF1 (HSP1) e HSF2.....	40
2.7.3 Heat shock 27KDa protein 1 (HSP27P1).....	42
2.7.4 DNA J subfamília B member 1 (DNAJB1) ou HSP40 ou HSPF1	43
2.7.5 Heat shock 70 KDa protein Like (HSP70 KDa Like ou HSPA1L)	44
2.8 Proteína transportadora de glicose	44
2.8.1 Transportador de Glicose 1 (Glut 1).....	44
2.9 Apoptose ou morte celular programada	45
3 HIPÓTESE	48
4 OBJETIVOS	49
4.1 Objetivo geral	49

4.2 Objetivos específicos	49
5 JUSTIFICATIVA	50
6 MATERIAL E MÉTODOS	51
6.1 Local do experimento	51
6.2 Delineamento experimental	51
6.3 Obtenção dos ovários.....	52
6.4 Aspiração dos ovários e seleção dos oócitos.....	52
6.5 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	53
6.6 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	53
6.7 Ativação partenogênética (AP).....	54
6.8 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	55
6.9 Avaliação da taxa de clivagem e congelamento de embriões com 8 células	55
6.10 Extração do mRNA e síntese de cDNA (DNA complementar)	55
6.11 Oligonucleotídeos.....	56
6.12 Análise quantitativa da expressão gênica em embriões bovinos	58
6.12.1 PCR em tempo real.....	58
6.13 Fixação e preparo dos blastocistos para TUNEL	60
7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
9 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma importante biotécnica para o melhoramento animal que vem sendo amplamente utilizada. Nesta, estão envolvidas as etapas de colheita dos oócitos, a maturação (MIV), a fertilização (FIV) e, posteriormente, o cultivo (CIV) *in vitro* até o estágio de blastocisto (SANTANA, 2012), quando o mesmo será transferido para uma receptora ou devido aos avanços alcançados, na ausência de receptoras aptas a recebê-lo, pode ser criopreservado (VARAGO *et al*; 2008).

A PIVE é uma valiosa ferramenta para difundir e acelerar a produção de animais geneticamente superiores além de impedir o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações que as impeçam de se reproduzir por meio de monta natural ou TE. (GONÇALVES *et al*; 2007). Essa ferramenta tem grande relevância para estudos biotecnológicos como a técnica de transferência nuclear (TN). Uma importante aplicação da TN está na associação com a tecnologia de modificação genética dos animais, os clones transgênicos, os quais podem ser utilizados para a produção de proteínas humanas recombinantes, para xenotransplantes e para estudos de doenças genéticas humanas. As aplicações da TN podem beneficiar estudos na medicina, na conservação animal e na ciência básica, como a diferenciação celular, a manipulação de genoma e a herança citoplasmática, contribuindo ainda para o conhecimento de genes *imprinted* e de fatores epigenéticos. (NEVES, MIRANDA e TORTORELLA, 2010).

O Brasil possui uma posição de destaque mundial, produzindo 220.425 embriões *in vitro*, correspondendo a 66,6% do total de embriões bovinos produzidos *in vitro* no mundo (VIANA *et al*; 2010). O crescimento da PIVE em bovinos se deve à demanda comercial. Isso requer ainda mais pesquisas para aumentar a eficiência. Em humanos, apesar dos avanços já alcançados, existem questões bioéticas que limitam o desenvolvimento de pesquisas (GOMES; 2007).

Com o intuito de contornar essas questões, sugeriu-se a partenogênese, que é definida como a produção do embrião, a partir do gameta feminino na ausência da contribuição do gameta masculino, com ou sem eventual desenvolvimento de um indivíduo (FUKUI *et al.*, 1992). Essa técnica tem sido

descrita como um método com potencial para se evitar as limitações éticas com pesquisas envolvendo embriões humanos fecundados, como estudos com células-tronco embrionárias (PAFFONI *et al.*, 2008). Entretanto, muitos aspectos biológicos dos embriões partenogenéticos ainda são desconhecidos.

Uma vez entendidas as diferenças biológicas entre embriões FIV e partenogenéticos, estes podem se tornar uma fonte alternativa de células-tronco e de ferramenta experimental devido à relativa rapidez e facilidade dos procedimentos de ativação partenogenética somada à homogeneidade do desenvolvimento desses embriões, podendo resolver muitos dos problemas éticos associados com o uso de embriões humanos para fins experimentais. Uma alternativa seria o uso de embriões bovinos em substituição aos embriões humanos em pesquisas, pela possível semelhança que apresentam.

O objetivo deste estudo foi comparar o desenvolvimento pré-implantacional e os aspectos celulares e moleculares entre embriões bovinos produzidos *in vitro* e partenogenéticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

O primeiro bebê que foi concebido pela utilização de técnicas de fertilização *in vitro* (FIV), termo empregado na reprodução humana em substituição a PIVE, trouxe para o âmbito científico a possibilidade de intervir no processo da reprodução humana, gerando esperança para casais com diagnóstico de infertilidade (MAKUCH, 2001; ORIÁ & XIMENES, 2004).

As pesquisas nessa área começaram muito antes do nascimento do primeiro bebê por FIV. Walter Heape transferiu com sucesso embriões de coelhos na década de 1890. Desde então, várias pesquisas foram sendo realizadas, tanto em humanos como em bovinos (BETTERIDGE; 2003). Bavister descreve que a descoberta em 1951 da capacitação de espermatozoide, ou o passo final na maturação do mesmo, foi fundamental para o desenvolvimento da fertilização *in vitro* (BAVISTER *et al*; 1992).

Robert Edwards e Patrick Steptoe, fisiologista e ginecologista, respectivamente, foram pioneiros em fertilização *in vitro* em seres humanos na Grã-Bretanha. Na década de 1960, Edwards alcançou a primeira fertilização de um oócito fora do corpo humano. Ao mesmo tempo, Steptoe estava trabalhando para desenvolver a nova técnica cirúrgica de laparoscopia (STEPTOE e EDWARDS, 1978).

Iritani e Niwa (1977) obtiveram os primeiros resultados de MIV e FIV de embriões bovinos, dando início aos primeiros passos da PIVE em bovinos.

Em humanos, após numerosos estudos, em 25 de julho de 1978, nasceu na Inglaterra Louise Toy Brown, o primeiro “bebê de proveta”, de FIV. Foi o evento mais importante até aquele momento em matéria de reprodução assistida, realizado por dois médicos ingleses (STEPTOE e EDWARDS; 1978).

Brackett *et al.* (1982) divulgaram o nascimento do primeiro bezerro FIV. Já Hanada *et al.* (1986), relataram o nascimento do primeiro bezerro a partir de oócitos maturados e fertilizados *in vitro*, porém com cultivo *in vivo*. E, finalmente, Lu *et al.* (1987) descreveram com sucesso o nascimento do primeiro bezerro após MIV, FIV e CIV.

Melhorias para o tratamento de FIV em bovinos e humanos foram realizadas, incluindo melhores técnicas de cultura, refinamentos nos protocolos de recuperação de oócitos e capacidade de recuperar os oócitos com uma sonda de ultrassom vaginal em vez de laparoscopia.

Com o desenvolvimento do método de punção folicular, tornou-se possível a recuperação de oócitos de fêmeas vivas para fecundação *in vitro* (FIV), abrindo novos caminhos para a multiplicação de animais de interesse econômico superando os atuais índices da TE, no que diz respeito à produção de bezerro por vaca por ano. Essa técnica pode ser utilizada em animais jovens, gestantes, lactantes ou com problemas de infertilidade adquiridos (GOODHAND *et al.*, 1999; TANEJA *et al.*, 2000).

Apesar da expressiva contribuição, a FIV ainda apresenta algumas deficiências nas etapas envolvidas (JANSSENS *et al.*, 2000; GARCIA, *et al.*, 2004). Estudos com animais não superestimulados demonstraram recuperação de 70% de *complexos cumulus oócitos* (CCOs) por aspiração folicular (SENEDA *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2004). É esperado que, após a MIV, em torno de 90% desses oócitos atinjam a metáfase II com expulsão do primeiro corpúsculo polar. Destes, 80% serão fecundados e começarão a se dividir, até um estágio de duas a quatro células pelo menos (BAVISTER *et al.*, 1992; LONERGAN *et al.*, 2001). No entanto, somente 10% a 40% são convertidos em Blastocisto (BI) (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006; LONERGAN e FAIR, 2008; RIZOS *et al.*, 2008), obtendo-se taxas de gestação não superiores a 50% (PETERSON e LEE, 2003; PONTES, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2010).

Essa biotecnologia possui muitas vantagens, como o aumento do potencial de exploração zootécnica de fêmeas de genética superior em um menor período de tempo (VARAGO *et al.*, 2008), instrumento importante para o melhor aproveitamento reprodutivo dos rebanhos, diminuindo o intervalo entre gerações e acelerando o melhoramento genético animal (PEGORARO, 1997). Quando aliada à técnica de transferência de embriões, torna possível aumentar a vida reprodutiva de animais de alto valor genético, como fêmeas que não respondem aos tratamentos de superovulação, fêmeas imaturas, idosas ou aquelas que apresentam infertilidade adquirida devido a patologias no trato reprodutivo, impossibilitando a fecundação e o desenvolvimento embrionário *in vivo*.

Outras vantagens da PIVE são a conservação e a regeneração de espécies animais em extinção (RUMPF, 2007) e o aprimoramento e a aplicação de técnicas como a clonagem por transferência nuclear, a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e a transgenia (CAMARGO *et al.*, 2006). Ainda representa um importante recurso para a pesquisa de eventos biológicos que ocorrem durante a MIV, a FIV, a CIV de oócitos, a capacitação espermática e os fenômenos relacionados ao desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação (GONÇALVES *et al.*; 2007).

As técnicas de reprodução assistida (TRA) empregadas atualmente para o tratamento da infertilidade vêm proporcionando grande desenvolvimento tecnológico. Uma revolução foi marcada com a técnica de injeção intracitoplasmáticas de espermatozoide (ICSI) em 1992, por Palermo e colaboradores, para o tratamento de infertilidade masculina grave. Embora se tenha alcançado grande avanço nas TRA nos últimos anos, os resultados de fertilização ainda não são totalmente satisfatórios (SAKKAS *et al.*, 1996; DUBEY *et al.*, 1997).

Aprimoramentos adicionais e vantagens para FIV em humanos também foram desenvolvidos, incluindo melhores protocolos de tratamento para as mulheres com mais de 40 anos e a técnica, chamada de incubação assistida, aumentando as chances de gestação bem sucedida. Com essa técnica, os embriões se desenvolvem no laboratório por até cinco dias antes de serem implantados no útero.

Avanços nesse campo da biomédica foram estrondosos e abruptos. Com a revolução médica, o mundo inteiro se alarmou quanto às consequências que tais métodos poderiam ter. Diante de tantas complicações surgiram questionamentos éticos, socioculturais, biológicos e psicológicos a respeito de tal intervenção técnica na natureza humana (FRAZÃO, 2000).

Estudos focando as mudanças de metilação ocorridas em mamíferos durante o desenvolvimento embrionário têm demonstrado maiores similaridades entre os modelos humanos e bovinos quando comparados ao modelo de camundongos. Devido a tais similaridades, tem-se sugerido que bovinos possam ser um modelo animal melhor do que camundongos para o estudo da reprogramação epigenética, substituindo de forma mais adequada a necessidade imediata de utilização de embriões humanos nas pesquisas (NIEMANN & WRENZICKI, 2000; WRENZICKI *et al.*, 2005)

Segundo Harris Lewin (2009), da Universidade de Illinois, Estados Unidos, apesar do período de evolução, bovinos e humanos conservam um grande grau de similaridade entre suas arquiteturas, inclusive muito maior do que entre o homem e o camundongo, um modelo experimental largamente empregado pela pesquisa biomédica.

Para evitar questionamentos, embriões partenogenéticos estão sendo propostos como modelos experimentais, ou mesmo o uso de embriões bovinos para pesquisas em substituição aos embriões humanos pela possível semelhança entre ambos.

2.2 Partenogênese

A produção de embrião, a partir do gameta feminino, na ausência da contribuição do gameta masculino, com ou sem eventual desenvolvimento de indivíduo, é definida como partenogênese (FUKUI *et al.*, 1992).

Essa forma de reprodução não é espontânea em mamíferos, embora seja uma estratégia reprodutiva de algumas espécies de insetos como moscas, formigas e abelhas, e também em alguns vertebrados como lagartos, peixes, anfíbios, cobras, entre outros organismos (HIPP & ATALA, 2004).

Partenotos humanos são de interesse para obtenção de células-tronco embrionárias (CTE) e geram todos tecidos embrionários, evitando problemas éticos. Poucos estudos dedicaram-se à ativação partenogenética de oócitos humanos (PAFFONI *et al.*, 2008). Assim, oócitos bovinos servem como um bom modelo experimental para extrapolação dos resultados aos humanos.

A partenogênese tem sido empregada como modelo para o estudo dos eventos bioquímicos e morfológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário inicial. Esse modelo vem sendo utilizado para a otimização de metodologias empregadas na transferência nuclear como protocolos de ativação (SHEN *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008). Dessa forma, a TNCS pode servir também para a produção de animais transgênicos portadores de proteínas recombinantes que auxiliariam em novas alternativas de tratamento em humanos (FREITAS, 2006; FREITAS *et al.*, 2007b).

Além disso, oócitos ativados partenogeneticamente são frequentemente empregados em experimentos de clonagem como controles das condições de

manipulação, tais como meio de manutenção, temperatura ambiente, metodologia e sistema de ativação, sistema de cultivo e qualidade intrínseca dos oócitos (SHEN *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008). Outra aplicação da partenogênese é a extração de células-tronco embrionárias em humanos, a qual está associada a interesses bioéticos. As células-tronco de embriões partenogenéticos podem ser utilizadas sem destruir um embrião viável, uma vez que os sinais partenogenéticos limitam o potencial de desenvolvimento *in vivo* (BOEDIONO *et al.*, 1991).

A complementação genômica parental é requerida para o desenvolvimento fetal a termo, em mamíferos. Devido à origem exclusivamente materna dos embriões partenogenéticos, importantes genes *imprinted* paternos não são expressos e, conseqüentemente, todo o desenvolvimento do concepto é comprometido (CAMPANHA, 2012).

2.2.1 Ativação partenogenética (AP)

Os oócitos dos mamíferos têm pouco tempo para serem ativados após a ovulação, seja naturalmente pela fecundação ou, artificialmente, pela ativação partenogenética. Passado muito tempo, são observados sinais de deterioração celular e redução nas taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário (GORDON *et al.*, 2002).

Oócitos bovinos ovulados ou maturados *in vitro* estão parados em metáfase II (MII) devido à alta concentração de MPF e de MAPK e só completam a meiose depois de ativados pelo espermatozoide ou por estímulo artificial (MÉO *et al.*, 2007). No processo de fecundação e de ativação do oócito, uma cascata de eventos é desencadeada e culmina com a formação do inositol trifosfato (IP₃), cuja principal função é levar estímulos de liberação do Ca²⁺ estocado no retículo endoplasmático (HAJNÓCZKY *et al.*, 2003). Sabe-se que os íons Ca²⁺ estão envolvidos na exocitose dos grânulos corticais e no controle da progressão do ciclo celular (GRUPEN *et al.*, 2002).

O MPF atua nos oócitos, promovendo a quebra do envelope nuclear, induzindo a condensação da cromatina e participando da formação do fuso meiótico (MADGWICK e JONES, 2007). Um único estímulo pode ser capaz de inativar o MPF, o que implica retomada da meiose, extrusão do segundo corpúsculo polar e formação dos pronúcleos (BARNES *et al.*, 1993).

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

2..2.2 Agentes ativadores

Na ausência do espermatozoide, diversos tratamentos são utilizados para simular artificialmente a ativação *in vitro* de oócitos bovinos, desde agentes químicos e físicos ou até mesmo com a combinação de ambos. A injeção citoplasmática de soluções contendo cálcio, de agonistas de receptores de inositol trifosfato, de ativadores de proteína G; a incubação com etanol, com cálcio ionóforo, com estrôncio e com timerosal ou a infusão de cálcio extracelular ou inositol trifosfato no citoplasma com subsequente exposição a pulsos de eletricidade, são meios de induzir oscilações intracelulares de cálcio (GRUPEN *et al.*, 2002).

A inativação temporária do MPF obtida com um pico de cálcio (cálcio inóforo, etanol, estrôncio), em combinação com a sua inibição persistente, que é induzida por inibidores da síntese proteica ou inibidores de proteína quinase, são os métodos de ativação mais eficientes (KARJA *et al.*, 2005).

Similarmente aos espermatozoides, o estrôncio induz a múltiplas e periódicas oscilações de cálcio intracelular, entretanto os pulsos de cálcio são menores em frequência e amplitude e mais longos em duração do que observados na fecundação (LIU *et al.*, 2002).

Já o etanol, promove um único pico intracelular de cálcio de amplitude maior e mais duradouro do que o pico inicial observado na fecundação (ROGERS *et al.*, 2006). Esse pico é originado pelo influxo de cálcio extracelular e pela liberação dos estoques internos (LOI *et al.*, 1998).

Os ionóforos de cálcio (Ionomicina e A23187) são compostos capazes de formar um complexo com o íon cálcio e transportá-lo através de membranas biológicas (WANG *et al.*, 1999), mas sua concentração e o tempo de exposição podem afetar a eficiência da ativação oocitária.

A cicloheximide, exemplo de inibidores de síntese proteica, é um composto que inibe a síntese do fator citostático, reduzindo o nível de atividade do MPF e desencadeando o reinício da meiose (GRUPEN *et al.*, 2002).

A roscovitine, um inibidor de proteína quinase, inibe o MPF, evitando a ligação da subunidade p34cdc2 ao ATP sem afetar a atividade de outras quinases (DENG e SHEN, 2000). Enquanto que o 6-dimetilaminopurine (6-DMAP) atua por meio da inibição de proteínas quinases, inibindo consequentemente a fosforilação de proteínas como a p34cdc2 e a MEK quinase, reduzindo desse modo, as atividades do MPF e MAPK (LIU *et al.*, 1998), acelerá-se a formação dos pronúcleos, além de contribuir para a desorganização dos microtúbulos e inibir a extrusão do segundo corpúsculo polar, determinando a formação de um embrião diploide (VITULO & OZIL, 1992). Após a remoção de 6-DMAP, o oócito reinicia a citocinese, mas nesse estágio, já ocorre a primeira divisão mitótica (clivagem), mantendo-se, portanto, a diploidia cromossômica (NAVARA *et al.*, 1994; MITALIPOV *et al.*, 2001).

A estimulação elétrica consiste em colocar os oócitos entre dois eletrodos, imersos em uma solução não eletrolítica que contenha manitol, sucrose ou glicose e submetê-los a um ou mais pulsos de eletricidade. As moléculas de açúcar fazem com que a membrana plasmática se desestabilize enquanto que o estímulo elétrico induz à formação de poros na bicamada lipídica, facilitando o influxo de cálcio extracelular. A amplitude e o tempo de duração do pico de cálcio são afetados pela voltagem aplicada e pela duração do estímulo elétrico. A membrana permanece permeável ao cálcio por muitos minutos (GRUPEN *et al.*, 2002).

2.3 Etapas da PIVE

A PIVE compreende as etapas de MIV, FIV, CIV de oócitos, a capacitação espermática e os fenômenos relacionados ao desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação (GONÇALVES *et al.*; 2007).

2.3.1 Maturação do oócito

Capacitação oocitária é o termo utilizado para a fase de desenvolvimento dos oócitos, na qual eles adquirem plena capacidade para desenvolver a sequência

de eventos da PIVE (HYTTEL, *et al.*; 1997). É considerada uma das fases mais importantes de todo o processo. Reservas bioquímicas serão produzidas pelos oócitos para que ocorra a manutenção do desenvolvimento embrionário inicial até a transição materno- zigótica (ativação dos genes do embrião), além de sintetizar enzimas capazes de diminuir o estresse oxidativo (HYTTEL, *et al.*, 1997). Normalmente, o potencial de desenvolvimento embrionário está intimamente ligado a características intrínsecas dos oócitos, como o folículo de origem, a morfologia, o estado de poliadenilação e a cinética das primeiras clivagens (MEIRELLES *et al.*, 2004).

Alterações nucleares e citoplasmáticas ocorrerão durante todo o processo de maturação. No núcleo, podem- se citar quebra da vesícula germinativa (GVBD); desaparecimento do nucléolo; condensação da cromatina; extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (MEINECKE *et al.*, 2001). Em se tratando de citoplasma podemos incluir, síntese de proteínas (SIRARD *et al.*, 1999), modificações moleculares (KUBELKA *et al.*, 2000); redistribuição das organelas intracelulares (STOJKOVIC *et al.*, 2001) e maturação dos mecanismos de liberação do Ca^{2+} (WANG *et al.*, 2003). No reinício e regulação de meiose, transformações estruturais são acompanhadas por uma série de atividades bioquímicas estabelecidas por uma complexa cascata de fosforilações e de desfosforilações de proteínas (DE SOUZA *et al.*, 2004; DEKEL, 2005 , DUMONT *et al.*, 2005). As proteínas do complexo MPF (fator promotor de maturação) e da família MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos) ocupam posição de destaque nesse período. Toda esta sincronia visando tornar o oócito imaturo capaz de ser fecundado e se tornar um embrião viável.

Apesar de sua complexidade, a maturação oocitária pode ser realizada *in vitro* após remoção do oócito imaturo do folículo e do cultivo em meio e ambiente adequados (EDWARDS, 1965; GORDON, 1994). Por outro lado, *in vivo*, é durante a fase de desenvolvimento folicular que o oócito adquire a competência para o posterior desenvolvimento (LONERGAN *et al.*, 2003a). A maturação inadequada do oócito, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário (XU e BRACKET, 1998).

2.3.2 Maturação nuclear

A maturação nuclear é caracterizada pelo oócito em estágio de metáfase II. Alguns eventos estão envolvidos no processo de maturação nuclear *in vitro*, ou seja, quando CCOs são removidos do ambiente folicular e ocorre o rompimento do contato físico com as células da granulosa, promove-se o fim das comunicações intercelulares via Junções “GAP”. Esse estímulo do oócito leva à condensação da cromatina e ao rompimento da vesícula germinativa, dando início à MII e a segunda retomada artificial do ciclo (EDWARDS, 1965).

A competência oocitária é adquirida durante a fase de crescimento, no momento que os oócitos atingem um determinado diâmetro de acordo com cada espécie (maior que 110 µm para ruminantes) (ANGUITA *et al*, 2007) que é quando a síntese e a estocagem de proteínas e de RNA ocorrem (CROZET *et al* , 1981). Algumas proteínas, como o fator promotor de maturação (MPF) no citoplasma, são importantes no processo de desenvolvimento do oócito antes e após a ativação do genoma embrionário (AGE) e são sintetizados durante a fase de crescimento do oócito ainda dentro do folículo (KRISHER, 2004).

O MPF é uma proteína quinase constituída por uma subunidade catalítica (p34) e por outra, regulatória (ciclina B) (GAUTIER e MALLER, 1991). É mediada por eventos de fosforilação e de desfosforilação, tendo sua atividade aumentada em estágio de quebra da vesícula germinativa, com alta atividade em metáfase I, decrescendo em anáfase e em telófase e alcançando outro pico em metáfase II. Está relacionada com a retomada da meiose, que é mantida por altos níveis de MPF no citoplasma do oócito (CROZET *et al.*, 2000).

2.3.3 Maturação citoplasmática

Alterações metabólicas ocorrem durante toda a maturação citoplasmática do oócito. Processos altamente complexos envolvem vários eventos simultâneos, como síntese de proteínas (SIRARD *et al.*, 1988), modificações moleculares (KUBELKA *et al*, 2000) e migração e reorganização de organelas no citoplasma (STOJKOVIC *et al*, 2001). Esses eventos tornam o oócito capaz de completar a maturação nuclear, a fecundação, a embriogênese precoce, o início da gestação e o desenvolvimento fetal normal (SIRARD *et al.*, 2006).

Várias mudanças na organização citoplasmática ocorrem durante a maturação oocitária, como um desenvolvimento contínuo da reserva lipídica, a redução do compartimento de Golgi, o rearranjo das mitocôndrias e o alinhamento dos grânulos corticais ao longo do oolema (BRITTO, 2011). Para que o oócito suporte o desenvolvimento após a fecundação até o estágio de blastocisto, ele precisa de uma reserva energética que, provavelmente, se dê por meio do aumento do compartimento lipídico (DIELEMAN *et al.*, 2002).

As células da granulosa também têm certa importância, pois são responsáveis pela aquisição de um fator que permite a descondensação da cromatina espermática e a substituição de suas nucleoproteínas (SZOLLOSI, 1993).

Grande parte dos oócitos bovinos sofrem maturação espontânea, em contrapartida pouco se sabe sobre os requerimentos para uma adequada maturação citoplasmática (CALDER *et al.*, 2003).

2.3.4 Maturação molecular

A maturação molecular corresponde à fase de crescimento do oócito. Envolve transcrição, armazenamento, processamento do RNAm, tradução de proteínas e eventos celulares como fertilização e formação de pró- núcleos (LIU *et al.*, 2009).

Ainda estão obscuros os mecanismos responsáveis pelo bloqueio e pela ativação da divisão meiótica. Acredita-se que estejam envolvidos no mecanismo molecular de controle do ciclo celular meiótico e mitótico a ativação do fator promotor de maturação (MPF) outros fatores, como inibidor da maturação do oócito (OMI) adenosina monofosfato cíclica (AMPC), íons cálcio produzidos por células foliculares e das próximas C-MOS e MAPK (mitogen- activated kinase protein) (GUERRA 2001; HAN; CONTI, 2006).

2.3.4.1 Fator promotor de maturação (MPF)

O MPF encontra-se em uma forma complexa fosforilada, com uma subunidade catalítica, a cdc2 e uma subunidade reguladora, a ciclina B (ARAÚJO *et al.*, 2007). Nas fases de reinício das divisões meióticas, os MPF apresentam atividade acentuada em oócitos, alcançando seu maior nível na meiose I, e seu

decréscimo, na transição de anáfase para telófase antes da liberação do primeiro corpúsculo polar. Após fertilização ou ativação partenogenética, o mesmo é degradado (KOVO *et al.*, 2006).

2.3.4.2 Proteína cinase ativada por mitógenos (MAPKs)

As MAPKs são proteínas envolvidas na progressão da meiose pertencentes à família das serina/treonina cinase (KUBELKA *et al.*, 2000). São conhecidas também por ERK (cinase regulada por sinal extracelular) por serem ativadas por sinais extracelulares (KRISCHEK e MEINECKE, 2002). Sua ativação é mediada por fatores de crescimento, com ativação menor pelo estresse, pelo efeito osmótico e pela desorganização dos microtúbulos. Está relacionada à fosforilação de diversos substratos como fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto (ROUX e BLENIS, 2004).

A via MAPKs é ativada durante a maturação meiótica em oócitos e as suas duas isoformas principais (ERK 1/2) são ativadas com o rompimento da VG (KUBELKA *et al.*, 2000), sugerindo que sua utilização não é requerida para o reinício da meiose e, sim, para eventos pós- rompimento da VG (KANO *et al.*, 2000; LEFEBVRE *et al.*, 2002). Em condições especiais, essa proteína induz ao rompimento da VG, promovendo o reinício da meiose (INOVE *et al.*, 1998).

2.3.4.3 Monofosfato de Adenosina cíclica (AMPC)

O AMPC originário das células foliculares está diretamente relacionado com a ativação do MPF. Alcança o oócito pelas junções *gap*, mantendo sua alta concentração via proteína quinase A (PKA). Quando em baixas concentrações, induz a degradação da vesícula germinativa, impedindo a comunicação entre as células foliculares e o oócito, levando à inativação da PKA, o que possibilita a reativação da divisão celular (DEKEL, 2005).

2.3.4.4 Inibidor de maturação oocitária (OMI)

O OMI é sintetizado pelas células da granulosa, sendo que as células da teca contribuem na amplificação desse sinal (KOTSUFI *et al.*, 1994). Wossarman e

Albertini (1994) sugeriram que o OMI é dos fatores que impedem o oócito de sofrer maturação meiótica *in vivo*. É encontrado no fluido folicular dos ovários.

Quando os CCOs são removidos dos folículos antrais e cultivados *in vitro*, retomam a meiose espontaneamente, mesmo sem a presença de hormônios, provavelmente pela retirada de algum fator inibidor presente no folículo íntegro. Sugere-se que esse fator seja o OMI (PINCUS e ENZMANN, 1935, citado por COELHO *et al.*, 2002).

2.3.4.5 Íons cálcio

A mobilização intracelular de cálcio é seguida por influxo de cálcio do ambiente extracelular. O aumento intracelular de cálcio induzido pela ativação do receptor inositol 1,4,5 – trifosfato (IP3R) presente na membrana do retículo sarcoplasmático influencia a ativação do oócito. A ativação do oócito está relacionada com a perda da membrana nuclear, com a desintegração da vesícula germinativa, com a condensação da cromatina em cromossomos bivalentes e com a separação dos cromossomos homólogos (WILLIAMS, 2002; TSAFRIRI e MOTOLA, 2007).

2.4 Fertilização *in vitro* (FIV)

A fertilização é um processo que envolve diversos mecanismos moleculares. O processo tem início com a penetração do espermatozoide através do oócito e culmina com a restauração do complemento diploide dos cromossomos (GALBINSKI, 2001).

Essa etapa depende muito da qualidade dos oócitos e dos espermatozoides (CARVALHO NETO, 2009). Quando os oócitos são de ovários de abatedouro, há muitas vezes variações na qualidade e na cinética de seu desenvolvimento (LABRECQUE e SIRARD, 2011). O sêmen também é uma fonte de variação, e a fertilidade do touro pode interferir na taxa de clivagem e produção de blastocisto (CAMARGO *et al.*, 2002; WARD *et al.*, 2002).

Após a maturação dos oócitos, os espermatozoides viáveis são separados a fim de iniciar sua capacitação e desencadear a reação acrossômica, alcançando sua capacidade fecundante. Sabe-se que a capacitação espermática

envolve mecanismos bioquímicos e estruturais que levam à eliminação de componentes aderidos à membrana espermática, ao aumento da permeabilidade aos íons Ca^{+2} , à mudança de pH interno e ao aumento da permeabilidade e do metabolismo celular (PALMA, 2001).

O oócito maturado e o espermatozoide capacitado estão prontos para se juntarem. Logo após a ligação à zona pelúcida do oócito, o espermatozoide sofre processo de exocitose celular, a reação acrossomal (PRESTES e LANDIM ALVARENGA, 2006), com posterior término da meiose. O segundo corpúsculo polar é liberado, deixando o oócito com um complemento haploide de cromossomos. A adição dos cromossomos do espermatozoide restaura o número diploide no gameta (WU *et al.*, 2001).

Logo após a incorporação do espermatozoide ao citoplasma do oócito, sua membrana nuclear desaparece e se inicia a descondensação do núcleo (YANAGIMACHI R, 1981). Assim que a cromatina espermática é exposta ao citoplasma do oócito, começa a perder protaminas, sendo estas substituídas por histonas (RODMAN *et al.*, 1981). Imediatamente após a fertilização, a superfície do oócito sofre modificações que impedem a penetração de espermatozoides adicionais, evitando-se, assim, que ocorra a poliespermia (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Após a descondensação do núcleo do espermatozoide, surge um novo envelope nuclear ao redor da cromatina descondensada (BEDFORD, 1972). Ou seja, as vesículas agregam-se ao longo da periferia da cromatina espermática dispersada e, progressivamente, fusionam-se para formar um envelope nuclear bilaminar (LONGO, 1973).

Formados os prónucleos, estes migram um em direção ao outro. Os microfilamentos participam da migração através da actina que recobre ambos prónucleos. Centros organizadores dos microtúbulos citoplasmáticos associam-se com os prónucleos durante o processo de migração e, pouco antes da dissolução das membranas, forma-se a placa metafásica, sobre a qual acomodam-se os cromossomos (MORO *et al.*, 1986). Assim está completo o processo para a primeira divisão celular e se inicia o desenvolvimento embrionário.

2.5 Cultivo *in vitro* (CIV) e desenvolvimento embrionário

Após o maior entendimento do processo de fecundação em mamíferos, meios capazes de favorecer o crescimento embrionário até o estágio de blastocisto começaram a ser desenvolvidos. Em 1967, um primeiro trabalho demonstrou que zigotos de rata evoluíam até o estágio de duas células embrionárias na presença de lactato e piruvato (WHITTINHAM e BIGGERS, 1967). Um ano depois, em 1968, Whitten e Biggers obtiveram desenvolvimento de embriões em um meio simples, sem o aporte de substâncias macromoleculares de origem materna. No entanto, durante o cultivo, muitos embriões paravam o desenvolvimento entre duas e 16 células, dependendo da espécie estudada.

Devido à grande dificuldade em transpor o bloqueio sofrido pelos embriões bovinos no estágio de oito células, pesquisadores de todo o mundo passaram a cultivar os embriões, utilizando tuba uterina de diferentes espécies animais incluindo camundongos, coelhos, ovelhas e até mesmo ovos de galinha para o cultivo de embriões bovinos (GORDON, 1975; FEHILLY *et al.*, 1984; PAPAIOANNOU e EBERT, 1986; BLAKEWOOD e ZHANG, 1993).

No final da década de 1980, os pesquisadores da área iniciaram o co-cultivo de embriões com células somáticas (GANDOLFI e MOOR, 1987). As células somáticas mais utilizadas foram as células do oviduto, as células da granulosa, as células VERO (linhagens celulares estabelecidas para cultivo), as células BRL (Buffalo Rat Liver Cells) entre outras (GORDON, 1994; GONÇALVES *et al.*, 2002). No co-cultivo com células somáticas, o meio de cultivo deve ser bastante rico, pois as células somáticas irão competir com os embriões pelos nutrientes. O benefício da adição das células somáticas está na produção de fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal - EGF, fator de crescimento tumoral α - TGF α e fator de crescimento tumoral β 1 - TGF β 1), na remoção de componentes inibitórios do meio de cultivo como radicais livres, metabólitos celulares, amônia e outros (THOMPSON, 1996; GONÇALVES *et al.*, 2002). No entanto, os compostos secretados pelas células apresentam concentração variada e nem sempre é possível identificá-los, podendo ocorrer alteração dos nutrientes presentes no meio, o que impede a

avaliação da relação dos componentes e as exigências do embrião (GORDON, 1994; GONÇALVES *et al.*, 2002).

Por essa razão, na década de 1990, o co- cultivo foi sendo substituído por outros meios de cultivo. Surgiram meios quimicamente definidos simples, como o Hamster Embryo Culture Medium (HECM), ou complexos, como o TCM-199 (Tissue Culture Medium), ambos sem a adição de soro (PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1991). Outro meio testado, e com bons resultados foi o Synthetic Oviductal Fluid (SOF), desenvolvido por Tervit *et al.* (1972), com base no fluido do oviduto de ovelhas, posteriormente modificado por Takahashi e First (1992).

O CIV é a etapa mais crítica de todo o processo, pois preconiza estabelecer um ambiente adequado para o zigoto até o estágio de blastocisto. Os embriões necessitam de certas substâncias e passam por condições adversas que, fisiologicamente, essas seriam supridas de imediato pelo ambiente intra- uterino (KNOBIL e NEILL, 2006). Além disso, o período embrionário pré- implantação é caracterizado por uma sucessão de divisões celulares mitóticas (PRESTES e LANDIM ALVARENGA, 2006). Nesse período, o zigoto sofre divisões celulares sem aumento da massa celular (HAFEZ e HAFEZ, 2004). A primeira clivagem separa o zigoto em dois blastômeros de tamanhos iguais e ocorre entre 11 e 20 horas após a fertilização (PRESTES e LANDIM ALVARENGA, 2006), havendo pouco aumento na taxa metabólica nesse período (HAFEZ e HAFEZ, 2004). A atividade genômica embrionária parece começar nesse período. Antes disso, sinais embrionários precoces podem derivar de uma reserva de RNAm materno (ARTLEY e BRAUDE, 1993) ou mesmo da contribuição paterna, já que alguns trabalhos citam a importância do RNA do espermatozoide durante o início do desenvolvimento embrionário (BUI *et al.*, 2011; LALLANCETTE *et al.*, 2008; BOERKEA *et al.*, 2007; OSTERMEIER *et al.*, 2005). Estudos recentes também citam a importância da análise do RNA paterno para avaliação da fertilidade masculina (DADOUNE, 2009).

Após as primeiras divisões, os blastômeros sofrem uma repentina mudança e começam a se amontoar e aumentam o contato entre si. As células formam entre si junções comunicantes que permitem o transporte de pequenas moléculas e íons entre elas (PRESTES e LANDIM ALVARENGA, 2006). Nesse estágio de clivagem pré-blastocistos, muitos embriões cessam seu desenvolvimento,

nem sempre devido a anomalias no embrião, e, sim, a falhas no momento de ativar o genoma embrionário (PARRISH, 1991), que nos bovinos ocorre em embriões de 8-16 células, sendo conhecida como “transição materno zigótica” (MZT) (BREVINI; GANDOLFI e GANDOLFI, 2001).

Mediante essas dificuldades e tentando minimizar esses efeitos, alternativas foram propostas a fim de melhorar as condições do CI, visto que o desenvolvimento embrionário está sujeito a variações tanto internas (modificações morfológicas da FIV até implantação) quanto externas (estresse, sinalização celular, atmosfera, meios e tipos de cultivo, entre outros). Anticorpos para proteínas do choque térmico (ESFANDIARI *et al.*, 2007), vitaminas, gonadotrofinas, fatores de crescimento e citocinas, podem ser adicionados aos meios de cultura e haver um melhor desenvolvimento embrionário. Além disso, os mesmos podem ser mantidos em co- cultivo com outros tipos celulares e minimizar os efeitos tóxicos do estresse oxidativo. Há também diferenças até mesmo entre touros, cujas diferenças possam ser usadas para discriminar a fertilidade dos mesmo a campo (WARD *et al.*, 2001). Portanto, vários são os fatores que podem influenciar o desenvolvimento *in vitro* e, podendo o excesso ou inibição de alguma substância vir a comprometer a produção de embriões (COELHO *et al.*, 2006). De acordo com Balasubramaniam *et al.* (2007), a cultura *in vitro* de embriões bovinos, em meio SOF, sob baixa concentração de O₂ (5%), proporcionou um ambiente mais favorável para a formação de blastocistos.

É possível ainda que haja expressão de alguns genes durante esse período para que os embriões possam sobreviver às condições de estresse nesse ambiente. Dentre os genes que podem estar sendo expressos, podem-se citar as HSPs (PAULA- LOPES e HANSEN, 2002). Nessa fase, podem, ocorrer alterações no padrão de expressão gênica devido à conformação da cromatina (NOWAK-IMIALEK *et al.*, 2008) o que pode levar à redução dos níveis de alguns transcritos (AAGAARD *et al.*, 2000).

2.6 Transição materno zigótica (MZT)

Após a fertilização, ficam depositados no citoplasma do zigoto os transcritos maternos. Transcorrido esse processo, esses transcritos serão degradados e substituídos por novos, porém do zigoto recém-formado. Denomina-se esse processo de transição materno zigótica (MZT) (HAMATANI *et al.*, 2004).

No reinício da meiose, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, os oócitos perdem a capacidade de transcrever as proteínas (FOULADI NASHTA, 1998; BLONDIN & SIRARD, 1995), restabelecendo essa função somente após a ativação do genoma embrionário, durante a MZT, que ocorre no quarto ciclo celular entre os estádios de 8 a 16 células nos bovinos (BREVINI *et al.*, 2002), sendo o oócito, o responsável pelas primeiras divisões zigóticas e pela ativação do genoma embrionário (BREVINI GANDOLFI & GANDOLFI, 2001).

Em seu crescimento, o oócito tem elevado grau de atividade transcricional, o que faz com que haja um acúmulo mRNAs de origem materna, os quais são necessários não só para o crescimento e maturação, mas, especialmente, para o desenvolvimento embrionário inicial (SONG & WESSEL, 2005). Portanto, a capacidade do oócito em se desenvolver e ter adequado desenvolvimento embrionário é resultado de um crescimento correto e de uma perfeita maturação nuclear e citoplasmática (BESSA, 2011).

Nos mamíferos, o oócito precisa acumular um *pool* de mRNA e de proteínas de origem materna durante a foliculogênese, necessários para sustentar a maturação e para o desenvolvimento até a ativação do genoma embrionário. Esses eventos conferem ao oócito o programa molecular necessário para a transcrição materno zigótica (DIESEL, 2010). Esse evento é denominado maturação molecular que se refere à síntese e ao acúmulo de RNAs e proteínas de origem materna para o início do desenvolvimento do embrião (DODE, 2006; SIRARD *et al.*, 2006).

2.7 Proteínas associadas à resposta ao estresse

2.7.1 Proteínas do choque térmico ("*Heat shock proteins*", HSP)

Para lidar com mudanças adversas no ambiente, estratégias foram desenvolvidas pelas células, como a resposta ao choque térmico ou a resposta ao estresse (WELCH, 1992). As proteínas do choque térmico são essenciais para a sobrevivência de células confrontadas com um agente ambiental estressante (WELCH, 1992). Constituem parte do grupo das chaperonas que são expressas intracelularmente em condições normais e apresentam aumento de sua expressão em situações de choque térmico (KOVALCHIN *et al.*, 2006; TSAN; GAO, 2004). São agrupadas por suas massas moleculares, em famílias, sendo as mais comuns HSP100; HSP90; HSP70; HSP60 e pequenas proteínas do choque térmico. Em mamíferos, as principais famílias de proteínas encontradas são as HSP70 (MORIMOTO *et al.*, 1994).

A proteína HSP 70 desempenha papel importante na resistência das células ao aumento da temperatura, estabilizando a estrutura proteica, reparando as proteínas desnaturadas, estabilizando o citoesqueleto, preservando a função normal dos ribossomos e impedindo a apoptose (HANSEN, 2002). Está envolvida em carrear proteínas recentemente sintetizadas ainda sem sua conformação terciária para a família HSP 60 e estaria relacionada ao transporte de proteína para a translocação dentro de diferentes compartimentos celulares (KIANG; TSOKOS, 1998).

Menor expressão dos genes que codificam proteínas *heat shock* sugere que a manutenção da homeostasia pode estar comprometida e prejudicar a viabilidade desses embriões (FERNÁNDEZ- GONZALES *et al.*, 2007, DAS e HOLZER, 2012). Matwee *et al.* (2001) sugerem que as proteínas de choque térmico desempenham papel essencial na fertilização e no desenvolvimento embrionário dos mamíferos. Porém, suas funções não foram totalmente elucidadas (RUPIK *et al.*, 2011).

Por intermédio da mudança conformacional de outras proteínas, da reunião de multicomplexos proteicos, de termotolerância e de anulação de

mutações, atribui-se à família das HSP função citoprotetora (HARTL; HAYER-HARTL, 2002).

Várias situações de estresse celular podem provocar aumento das HSPs, tais como calor (LOCKE e NOBLE, 1995), desafios metabólicos, incluindo análogos de aminoácidos; vários metais pesados; agentes que atacam os grupos sulfidríla das proteínas; alguns ionóforos; venenos metabólicos que afetam a produção de ATP (WELCH, 1992); privação de glicose; contato com toxinas bacterianas; estresse oxidativo; mecânico e por citocinas (FEHRENBACH e NIESS, 1999) e situações de reparação tecidual, na qual há atividade de proliferação e de diferenciação celular (KOVALCHIN *et al.*, 2006; TSAN; GAO, 2004), afetando de modo adverso a conformação correta e, conseqüentemente, a função das proteínas (MINOWADA, 1995).

As HSPs têm papel de chaperonas e, em condições normais, estão envolvidas na mediação do dobramento estrutural e no transporte de outras proteínas intracelulares, além de manutenção de proteínas em estado inativo e de prevenção de sua degradação proteica. A outra função está associada à sua indução e ação como resposta a estímulos de estresse celular (NEUER *et al.*, 2000).

Há componentes dessa classe de proteínas que são expressos constitutivamente (HSC), ou seja, em células não submetidas a condições de estresse e, quando expressas em condições de estresse, as formas induzíveis se somam às constitutivas (MEYER e DA SILVA, 1999).

2.7.2 Heat shock factors - HSF1 (HSP1) e HSF2

A regulação dos genes HSP pelo calor requer a ativação e a translocação para o núcleo de uma proteína transregulatória, o HSF, que reconhece e se liga a uma sequência de elementos localizada no promotor do gene HSP, denominado HSE (*heat shock elements*) deflagrando o processo de transcrição (SANTORO, 2000; TRINKLEIN *et al.*, 2004).

O HSF1 está presente tanto em células submetidas como não submetidas a qualquer tipo de estresse. Ele é expresso na forma de um monômero inerte ligado à HSP70 e a outras chaperonas quando na ausência de estresse. Estabelece-se maior necessidade de chaperonas (HSP70, HSP90) para prevenir o surgimento de

agregados de proteínas desnaturadas na presença de um agente estressante capaz de provocar um súbito aumento na presença de proteínas não nativas. Em consequência, as chaperonas dissociam-se dos monômeros de HSF1, permitindo que estes assumam um estado trimérico, sejam fosforilados nos resíduos de serina e translocados para o núcleo. A partir desse momento, ligam-se aos HSEs, localizados a montante dos genes HSP, resultando na transcrição induzida por estresse. Com a síntese de HSP aumentada, é restabelecido o equilíbrio inicial entre chaperonas livres e ligadas à proteína não nativas. Para reprimir o processo de transcrição de genes HSP, estas se deslocam para o núcleo e se ligam ao domínio ativador de transcrição dos HSF1 (SANTORO, 2000; FEHERENBACH e NIESS, 1999).

Considerados fatores estresse- responsivos rapidamente ativos, além do HSF1, ainda existem o HSF2, 3 e 4. O HSF2 (co- expresso) é ativado em resposta a distintos estímulos de desenvolvimento e de diferenciação. O HSF3 parece ser importante co- regulador do HSF1, aumentando a habilidade celular de regular com precisão a resposta ao choque térmico. É ativado principalmente por exposição a altas temperaturas e condições severas de estresse. Já o HSF4, reprime a expressão dos genes HSP, atuando como regulador negativo da resposta ao choque térmico (SANTORO, 2000).

A atividade constitutiva HSF2- HSE desenvolve- se progressivamente em torno das fases de 8 células ou mórula (MEZGER *et al.*, 1994). O HSF2 pode estar envolvido na expressão de HSPs, regulando (inibindo) a sua expressão ou a de outros genes do desenvolvimento que ainda possam ser descobertos (HEIKKILA, 1993; MEZGER *et al.*, 1991; MORIMOTO *et al.*, 1994; WU.,1995; MURPHY *et al.*, 1994; MEZGER *et al.*, 1989; KOTHARY *et al.*, 1987; GIEBEL *et al.*, 1988; LEGAGNEUX *et al.*, 1989). Alguns resultados sugerem ainda a existência de isoformas de HSF2 (HSF2- α e HSF2- β) e que os mesmos tenham funções distintas. O HSF2- α atua como um ativador e HSF2 β - como um supressor da transcrição induzida de genes de choque térmico em células K562 (LEPPÄ *et al.*,1997).

Ele, que foi isolado de uma biblioteca de cDNA, por homologia partilha como HSF1 um domínio de ligação ao DNA, e um domínio de fecho de leucina semelhantes, sendo bastante diferente nos outros domínios (GOODSON *et al.*,

1995). Além disso, HSF2 modula HSF1 mediada regulação de outros genes HSP (OSTLLING *et al.*, 2007).

Os mecanismos que levam à ativação de HSF1 e HSF2 são diferentes. Como já descrito anteriormente, quando ativado por choque térmico ou por outro fator estressante, o HSF1 sofre uma transição de monômero em trímero juntamente com modificações no seu estado de fosforilação e de uma translocação nuclear (SARGE *et al.*, 1993).

Já o HSF2, é um dímero quando inativado e um trímero, após a ativação (SISTONEN *et al.*, 1994), não sendo sua atividade induzida pelo calor e por outros tipos de estresse (FIORENZA *et al.*, 1995). As propriedades de ligação de HSF1 e HSF2 são um pouco diferentes (KROEGER *et al.*, 1993), embora com o mesmo consenso (GAA repetido em orientações invertidas).

O HSF1 necessita de quatro ou cinco repetições para se ligar, enquanto o HSF2 necessita de três repetições invertidas (KROEGER & MORIMOTO, 1994).

O HSF2 não está presente no oócito imediatamente após a fertilização e tem sua expressão aumentada durante o desenvolvimento pré-implantacional (KUBOTA *et al.*, 1994).

2.7.3 Heat shock 27KDa protein 1 (HSP27P1)

A HSP27 pertence à família de moléculas de baixo peso molecular, sendo induzível por choque térmico, mas também expressa constitutivamente (MOURNIER e ARRIGO, 2002). Ela se localiza no citosol em condições normais e é translocada ao núcleo em condições de estresse, estando associada à proteção celular a fenômenos de apoptose, interferindo nas etapas do processo apoptótico e de manutenção da integridade do citoesqueleto (MOURNIER e ARRIGO, 2002).

A HSP27 é implicada na inibição da apoptose ativada por caspases, ao manter a integridade da mitocôndria, e podendo ligar-se diretamente com citocromo C (GABAI e SHERMAN, 2002). Essa HSP é expressa de forma constitutiva em concentrações relativamente baixas pela maior parte das células de mamíferos, se bem que seu nível de expressão e estado de fosforilação variam em função da exposição a vários fatores. Quando em adição do estresse, ela exhibe uma indução de sua expressão de 10 a 20 vezes maior que em repouso (NEVES, 2010).

2.7.4 DNA J subfamília B *member 1* (DNAJB1) ou HSP40 ou HSPF1

A família da HSP40, homólogo humano da DNAJ em procariotos ou HSPF1, consiste em mais de 100 membros, definidos pela presença de um domínio J altamente conservado de aproximadamente 78 aminoácidos. Essa proteína interage com as HSP70 para desempenhar funções específicas na montagem, no dobramento e no redobramento de proteínas durante uma variedade de processos celulares, incluindo replicação de DNA, translocação de proteína e resposta ao estresse (FRYDMAN *et al.*, 1994; LU & CYR, 1998; FINK, 1999). A região N-terminal de domínio J e a região rica em G/F são necessárias para a interação com os HSP70 e para estimular a atividade ATPásica da mesma (FINK, 1999).

A HSP40 não possui atividade de “chaperona” e, isoladamente, não tem capacidade de suprimir a agregação de proteínas desnaturadas, promovendo a renaturação dessas proteínas em cooperação com HSP70. A expressão da HSP70, associada à HSP40, oferece maior proteção contra fatores estressantes, uma vez que a atividade de chaperone molecular da HSP70 é aumentada quando na presença da HSP40 (OHTSUKA & SUZUKI, 2000). Evidências *in vitro* sugerem que cada HSP70 requer uma HSP40 para um eficiente dobramento de proteínas (LU & CYR, 1998).

Dois modos de interação entre HSP70 e HSP40 são propostos. Mudanças conformacionais, resultantes da ligação do substrato, facilitariam a ligação à fenda no domínio ATPásico e a consequente hidrólise do ATP fortaleceria a ligação da HSP70 com esses substratos pré-ligados, ou seja, a interação entre HSP40 com um complexo HSP70 substrato. Outro modo de interação sugerido, é o de que a HSP40 primeiro interaja com um polipeptídeo desconfigurado, conduzindo-o, então, a se ligar com a HSP 70. Nesse caso, o sítio de ligação de substrato da HSP70 estaria vazio, permitindo a interação inicial da HSP40 com o sítio de ligação de substrato da HSP70, facilitando a interação subsequente entre o tripeptídeo conservado (Hés- Pro- Asp) no domínio J e a fenda inferior do domínio ATPásico. Uma mudança subsequente na conformação poderia promover a dissociação da HSP40 do domínio de ligação de substrato, permitindo ao substrato ligado à HSP40 ser transferido para a HSP70 (FINK, 1999; SUH *et al.*, 1999).

Os transcritos do *DNAJB1* são encontrados no espermatozoide e podem ser entregues aos oócitos no momento da fecundação, contribuindo com a detecção de uma maior quantidade desse transcrito. O mesmo pode ocorrer com os transcritos do *HSPA1L* (OSTERMEIER *et al.*, 2004).

2.7.5 Heat shock 70 KDa protein Like (HSP70 KDa Like ou HSPA1L)

O enovelamento das proteínas, *in vivo*, é auxiliado por proteínas HSPs, ou chaperonas, como HSPA1A e HSPA 1L. Elas previnem a agregação de proteínas enoveladas erroneamente e, com isso, haverá uma maior eficiência na síntese proteica (PATTERSON; HOHPED, 2006).

A proteína HSPA1L é uma variante da HSPA1A, possuindo a mesma função desta, ou seja, estabiliza proteínas contra a agregação e interfere no enovelamento de algumas proteínas recém- traduzidas, cuja localização está tanto no citosol quanto em organelas. Assim, protegem as células contra danos oxidativos e retardam a apoptose (HOVING *et al.*, 2000).

2.8 Proteína transportadora de glicose

2.8.1 Transportador de Glicose 1 (Glut 1)

A glicose, por ser uma molécula polar, é transportada por difusão facilitada na maioria das células e nesta envolve proteínas transportadoras (PAPA, 1997). Após a entrada nas células embrionárias através dos transportadores de glicose, ela pode entrar na via pentose fosfato ou ser metabolizada pela via glicolítica, gerando, através da glicólise, o piruvato, o qual pode ser transformado em lactato ou em acetil- CoA, podendo haver continuação do seu metabolismo pelo ciclo do ácido tricarboxílico e a da via de fosforilação oxidativa (THOMPSON *et al.*, 1996; HARVEY *et al.*, 2002; RIEGER *et al.*, 1992).

No estágio inicial de desenvolvimento, os embriões bovinos possuem limitada capacidade de utilizar a glicose, dependendo para o fornecimento de energia da oxidação de nutrientes como piruvato e aminoácidos (THOMPSON *et al.*, 1996). O oócito e as células do *cumulus* utilizam glicose com único substrato energético, mas o mesmo é fornecido como piruvato (BIGGERS , WHITTINGHAM e

DONAHUE, 1967). Embriões de ratos têm predileção pelo piruvato nas primeiras divisões celulares, enquanto que, posteriormente, estão presentes lactato e piruvato (WALES e WHITTINGHAM, 1967). Embriões nas primeiras divisões celulares consomem piruvato e, durante a formação e compactação do blastocisto, utilizam a glicose como substrato energético principal (LEESE & BARTON, 1984).

O GLUT 1 que pertence à família facilitadora de transportadores de glicose é expresso no oócito e no embrião em todas as fases de desenvolvimento (PANTALEON *et al.*, 1997). No oócito, já é expressa logo após a MIV (WRENZICKI *et al.*, 2005). O GLUT 1 é indispensável na evolução do embrião do estágio de mórula para blastocisto, pois nas células embrionárias este é o medidor da incorporação de glicose (LEESE, 1995).

Pantaleon *et al.*, 2001 citam que os espermatozoides podem estimular o metabolismo dos oócitos. Estudos têm demonstrado a colaboração do espermatozoide na atividade glicolítica, porém os resultados são incertos (URNER e SAKKAS *et al.*, 1996; URNER e SAKKAS *et al.*, 1999).

2.9 Apoptose ou morte celular programada

A apoptose é um processo de morte celular que afeta células isoladas, não comprometendo tecidos próximos e sem resposta inflamatória associada (HARDY, 1999). É um tipo de morte celular altamente conservadora e desempenha importante papel no desenvolvimento embrionário e homeostase celular, atuando como um mecanismo de controle de qualidade para remover células que são danificadas, não funcionais, anormais, e em número excessivo (JACOBSON *et al.*, 1997; MEIER *et al.*, 2000; PAULA-LOPES e HANSEN, 2002).

A apoptose é um processo fisiológico ativo da condensação da cromatina, da redução do volume celular e caracterizada pela formação de vesículas na membrana denominadas de corpos apoptóticos, resultando na fragmentação e na eliminação da célula (SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 1993). O embrião pode apresentar apoptose durante a formação da blastocle ou ainda durante o CIV em condições de estresse (HANDYSIDE & HUNTER, 1986; BYRNE *et al.*, 1999; VAN SOOM *et al.*, 2002).

Dentre inúmeras importâncias da apoptose, podem-se citar a eliminação de grande número de linfócitos autorreativos durante os eventos de rearranjo

genético na formação dos receptores de antígeno e ao mesmo tempo esse mecanismo mantém a população de linfócitos relativamente constante (RATHMELL & THOMPSON, 2002), para a seleção de folículos dominantes, contribuindo, assim, na manutenção da homeostase ovariana (HURWITZ & ADASHI, 1992; TILLY *et al.*, 1991), entre outros.

Devido à sua complexidade, ela pode ser desencadeada por estímulos, dentro ou fora da célula. A via extrínseca é desencadeada por estímulos externos à célula (Fator de Necrose Tumoral α -TNF α , irradiação, drogas), e a via intrínseca é desencadeada por estímulos internos (dano ao DNA, estresse oxidativo). Todas as vias podem levar à ativação de proteínas pró- apoptóticas da família Bcl-2, de caspases, e oncogenes como o p53 (GEWIES, 2003).

O perfil apoptótico é mais pronunciado em embriões partenogênicos do que FIV (GÓMEZ *et al.*, 2009a). Alguns autores relatam que embriões partenogênicos têm maiores índices de apoptose que os FIV (NEUBER *et al.*, 2002; HAO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2008) e menos células totais (GÓMEZ *et al.*, 2009a).

Como métodos de detecção da apoptose comumente empregados, podem- se citar a coloração por hematoxilina e eosina (CAGNOTO *et al.*, 2009), método de COMETA (TAKAHASHI *et al.*, 1999) e detecção da atividade de caspases e proteínas relacionada a apoptose (ALEXANDRE *et al.*, 2000). Porém, os métodos utilizados para detecção em embriões pré- implantacionais são o TUNEL (*Deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end labeling assay*) e Anexina- V iodeto de propídio (LEVY *et al.*, 1998).

A técnica que é fundamentada na detecção da fragmentação do DNA nuclear é o teste de TUNEL, pois essa fragmentação é característica de apoptose tardia (YUAN *et al.*, 2003), cuja enzima deoxinucleotidil transferase adiciona nucleotídeos biotinilados marcados com fluoresceína no local de quebra da fita de DNA da célula em apoptose, sendo visualizada por microscopia de epifluorescência (YUAN *et al.*, 2003).

Já a técnica da Anexina- V, é fundamentada na afinidade dessa molécula com a fosfatidilserina, fosfolípido de membrana plasmática. Quando a apoptose é tardia, ocorre fragmentação do DNA nuclear com exposição de extremidade 3', à qual o iodeto de propídeo se intercala. Assim, a Anexina- V iodeto detecta a

fragmentação do DNA e também a exposição extracelular da fosfatidilserina (ORMED *et al.*, 1993).

3 HIPÓTESE

Embriões bovinos partenogénéticos possuem capacidade de desenvolvimento e de características celulares e moleculares semelhantes aos embriões fecundados *in vitro*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Comparar o desenvolvimento embrionário e as características celulares e moleculares entre embriões fecundados *in vitro* (FIV) e partenogênicos (Part).

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a cinética de desenvolvimento embrionário nos dois grupos (FIV x Part);
- Avaliar índice de apoptose em blastocistos fecundados *in vitro* ou ativados partenogeneticamente;
- Identificar possíveis diferenças entre embriões fecundados *in vitro* ou ativados partenogeneticamente quanto à expressão de genes relacionados ao estresse e ao metabolismo celular.

5 JUSTIFICATIVA

A relativa rapidez e facilidade dos procedimentos de ativação partenogenética, somada à homogeneidade do desenvolvimento desses embriões, se comparados aos fecundados *in vitro*, podem torná-los bons modelos experimentais para a pesquisa embrionária sem o sacrifício de embriões fecundados, bem como podem ser fontes de células para estudos com células-tronco, especialmente em humanos. Portanto, estudos comparando o desenvolvimento embrionário e as características celulares e moleculares são necessários para se identificar as similaridades e as diferenças entre embriões partenogenéticos e fecundados *in vitro*.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Local do experimento

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Reprodução Animal e no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, localizados em Juiz de Fora- MG, Brasil.

6.2 Delineamento experimental

Para o experimento, foram realizadas 7 repetições, recuperados 1541 oócitos obtidos de ovários de vacas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) abatidas em frigorífico. Uma média de 220 oócitos foram recuperados por repetição e foram aleatoriamente divididos em dois grupos: grupo da partenogênese (Part) e grupo da fecundação *in vitro* (FIV). Após fecundação *in vitro* ou ativação para indução da partenogênese, os possíveis zigotos dos dois grupos foram cultivados *in vitro* nas mesmas condições. Com 72h após a fecundação ou a ativação para partenogênese (hpfa), os embriões de ambos os grupos (Part e FIV) foram classificados e divididos de acordo com o número de células, conforme segue: embriões com menos de oito células (<8cel) e embriões com oito ou mais células ($\geq 8\text{cel}$). Desse modo, foram constituídos quatro tratamentos: Part<8cel, Part $\geq 8\text{cel}$, FIV<8cel e FIV $\geq 8\text{cel}$. A Figura 1 mostra o delineamento experimental.

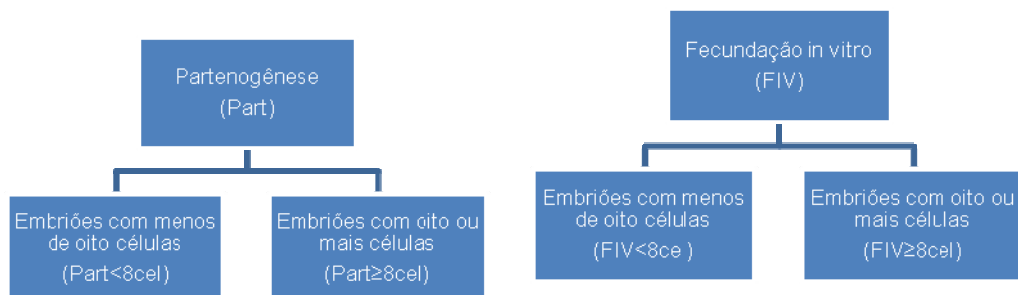


Figura 1. Organograma mostrando os grupos (partenogênese e fecundação *in vitro*) e os tratamentos experimentais.

Possíveis embriões de oito células (72 horas) foram congelados para a avaliação da expressão gênica e blastocistos (192 horas) foram fixados para avaliação do índice de apoptose.

6.3 Obtenção dos ovários

Os ovários foram obtidos de vacas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) abatidas no frigorífico Fri Pai, localizado em Juiz de Fora – MG. Os ovários foram acondicionados em garrafa térmica com solução fisiológica contendo 18 g de NaCl acrescida de antibiótico (0,05g/L Estreptomicina) aquecida a 36-37 ° C, sendo transportados em no máximo 3h após o abate para o laboratório.

6.4 Aspiração dos ovários e seleção dos oócitos

No laboratório, os ovários foram lavados em solução fisiológica acrescida de antibiótico e depositados em um *becker* contendo a mesma solução, onde foram mantidos em banho- maria a 36°C. Imediatamente, os folículos com diâmetro de 2-8mm foram aspirados com auxílio de seringa descartável de 10 ml e agulha hipodérmica descartável 30 x 0,80 (21G) Descarpac®.

O conteúdo aspirado foi depositado em um cálice cônico, mantido em banho- maria e protegido da luz, até que todos os ovários fossem aspirados. O mesmo ficou decantando por um período de 15 minutos para posterior retirada do sobrenadante e ressuspensão do precipitado em meio TALP- Hepar (Tyrode-albumina lactato- piruvato) (Sigma St. Louis, EUA).

O precipitado ressuspendido foi vertido em placa de Petri (Corning®) descartável de 100 x 20mm, mantido sobre placa aquecedora a 36°C.

Para a MIV, foram selecionados somente COCs imaturos, com citoplasma homogêneo e com no mínimo três camadas de células, classificados em grau 1 e 2, segundo Viana *et al.* (2004).

6.5 Maturação *in vitro* (MIV)

Os CCOs selecionados foram divididos em grupo de 40-60 estruturas, depositados nos poços das placas tipo Nunc[®] contendo 400 µl de meio TCM (Tissue Culture Medium 199) (Gibco Brl Life Technologies, Nova York, EUA) e maturados por 24 horas em estufa incubadora a 38,5°C com atmosfera controlada a 95% de umidade e 5% de CO₂. Ao final da MIV, os oócitos foram submetidos a FIV ou à ativação partenogênética, conforme o delineamento experimental.

6.6 Fecundação *in vitro* (FIV)

O sêmen do touro utilizado foi previamente avaliado quanto à motilidade (igual ou superior a 50%), ao vigor (igual ou superior a 3) e à concentração. O sêmen do touro selecionado foi sempre da mesma partida e lote para evitar possíveis variações .

O sêmen foi descongelado em banho- maria a 37°C por 30 segundos e colocado em microtubo tipo Eppendorf[®] (Hamburgo, Alemanha), previamente aquecido. Em seguida, uma amostra foi retirada para a avaliação da motilidade e do vigor no pós- descongelamento e o restante, 250µl de sêmen, foi depositado em outro microtubo tipo Eppendorf[®] sobre o gradiente de Percoll[®] (Nutricell Campinas, Brasil). O gradiente de Percoll foi preparado previamente com 400 µl do gradiente 90% e sobre o mesmo 400 µl do gradiente 45% e mantido em estufa por no mínimo 15 minutos antes de ser utilizado. O microtubo tipo Eppendorf[®] com as duas concentrações de Percoll e uma fase de sêmen foi centrifugado em microcentrífuga a 10.000 x g durante 5 minutos.

Após essa etapa, o sobrenadante foi retirado e o pellet formado foi ressuspensionado com 400 µl de meio Fert- Talp[®] e levado novamente para centrifugação a 10.000 x g por mais 3 minutos. Passada a segunda centrifugação, o sobrenadante foi novamente retirado e o novo *pellet* formado foi ressuspensionado com 70 µl de meio Fert- Talp[®]. Uma amostra do ressuspensionado foi retirada para a avaliação da motilidade, do vigor e da concentração, pós- centrifugação. A concentração foi ajustada para se obter dose fecundante de 2×10^6 espermatozoides/ml para, posteriormente, se juntar aos CCOs na placa de fertilização.

Os CCOs foram retirados da placa de maturação, lavados três vezes em meio Fert- Talp e transferidos para as gotas de fertilização de 100 µl, contendo o mesmo meio de lavagem, sob óleo mineral. Foram mantidos em estufa incubadora a 38,5°C com atmosfera controlada a 95% de umidade e 5% de CO₂ por um período de 18- 20 horas. Ao final do período de FIV, os presumíveis zigotos foram retirados da gota de fertilização, colocados em tubo tipo Falcon® (BD Falcon, EUA) de 15 ml contendo 2mg/ml de hialuronidase em solução de DPBS® (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) (Gibco) e agitados em aparelho tipo Vórtex por 5 minutos para remoção das células do *cumulus*. Em seguida, foram lavados em meio TALP-Hepes, vertidos em placa de Petri® descartável de 60x15 mm e recuperados antes de seguirem para o CIV.

6.7 Ativação partenogénica (AP)

Após a MIV do grupo dos ativados, os oócitos foram removidos da placa e colocados em tubo Falcon® de 15 ml contendo 2mg/ml de hialuronidase (Sigma) em solução DPBS® (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) (Gibco). Em seguida, foi realizada a agitação em aparelho tipo Vórtex por 5 minutos para remoção das células do CCOs. Os oócitos já desnudos foram vertidos em placas de Petri® descartável de 60x15 mm para recuperação dos mesmos. Em seguida, foram lavados com TALP- Hepes®, para depois serem incubados a 38,5° C em estufa com 5% de CO₂ em ar atmosférico e umidade saturada por quatro minutos em solução de Ionomicina (4,62 µM) (Sigma) em meio CR2aa.

Decorrido esse período, os mesmos foram lavados em meio CR2aa e incubados por mais quatro horas em solução de 6-DMAP® (Sigma) em concentração de 2 mM em DPBS® a 38,5° C em estufa de 5% de CO₂, 5% em ar atmosférico, além da umidade saturada. Após essa etapa, os oócitos foram retirados da solução de 6-DMAP®, lavados em CR2aa e, depois, colocados em cultivo.

6.8 Cultivo *in vitro* (CIV)

O CIV foi realizado em placas de quatro poços tipo Nunc[®] (Roskilde, Dinamarca), contendo 400 µl de meio CR2aa em cada poço, acrescido de 2,5% de soro fetal bovino (SFB), sob óleo mineral. Os presumíveis zigotos Part e FIV, após o período de ativação e de fecundação, respectivamente, foram contados e colocados em estufa incubadora a 38,5° C, atmosfera controlada com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ em umidade saturada.

6.9 Avaliação da taxa de clivagem e congelamento de embriões com 8 células

Aproximadamente 72 horas após a Part e FIV, os embriões presentes na placa de cultivo foram contados, classificados quanto à ocorrência ou não de clivagem e avaliados quanto ao número de células das estruturas clivadas. Os embriões foram distribuídos de acordo com o estágio da divisão celular em embriões com menos de 8 células (<8cel) e embriões com 8 ou mais células (≥8cel), a fim de se avaliar o potencial de desenvolvimento embrionário a partir desses estádios.

Após avaliação, um grupo de 10 embriões de cada tratamento com oito células foram lavados em meio DPBS[®] acrescido de 0,1% de álcool polivinil (PVA) cold (Sigma-) e transferidos para criotubos com o menor volume de meio possível (1 µl). Em seguida, foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultra freezer - 80° C para posterior análise de expressão gênica.

6.10 Extração do mRNA e síntese de cDNA (DNA complementar)

A extração de RNA e a transcrição reversa foi realizada, utilizando-se *kits* comerciais Micro Kit RNAesay (Qiagen, Hilden, Alemanha) e Superscript III Kit (Invitrogen, Califórnia, EUA), respectivamente em *pools* de 10 embriões.

Durante a extração do RNA, a lise das células foi realizada com tampão RLT acrescido de 10% de β – Mercaptoetanol (β-ME, Gibco Brl life Technologies, Nova York, EUA). Ao lisado, foi acrescentado etanol 70% e o mesmo foi transferido

para uma coluna (Spin Column) para a obtenção do RNA. Para a lavagem, adicionou-se tampão RW1 e, posteriormente, foram incubados em solução de DNase (Desoxirribonuclease) por 15 minutos. Posteriormente, procedeu-se à lavagem com solução tampão de RW1 e solução tampão RPE. Para proceder à secagem da membrana onde se encontrava o RNA, foi realizada a adição de etanol 80% na coluna, seguida de centrifugação. Foram utilizados para a eluição, 12 µl de água RNase-free, gerando volume final de 11µl. Após a extração do RNA, 1µl da amostra foi avaliado em espectrofotômetro (Nanodrop ND- 1000, Wilmington, EUA), para analisar a concentração e a pureza da amostra (Tabela 1). Em seguida, a amostra passou pela transcrição reversa.

Para a transcrição reversa, foram utilizados 6 µl (30 ng) de RNA para cada reação de síntese de cDNA. Uma reação contendo RNA, primer oligo dT, tampão de pareamento e água RNase/DNase free, foi incubada por cinco minutos a 65° C. Posteriormente, foram adicionados à reação 12 µl de mix (2x First- Stand reaction mix e Super Script III RNase OUT Enzyme mix) seguido de incubação a 50° C por 50 minutos e 85° C por 5 minutos. O volume final de cada reação foi de 20 µl (-10.200 ng) de cDNA. Após transcrição reversa, 1µl da amostra foi avaliado novamente em espectrofotômetro (Tabela 1), para analisar a concentração e a pureza da amostra, e em seguida, o material foi armazenado em ultra- freezer - 80° C, até a sua utilização.

Tabela 1. Valores médios da concentração e da pureza da amostra (embriões de 8 células) dos grupos FIV e Part.

	RNA 260/280	cDNA 260/280	ng/µl RNA	ng/µl cDNA
Part	1,45±0,03	1,60±0,00	10,4±1,00	741,55±11,61
FIV	1,52±0,04	1,60±0,00	6,54±2,80	683,8±8,76

Valores são mostrados como média±EPM.

6.11 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para avaliar a expressão dos genes alvos e do gene referência endógeno (BETA- ACTINA e *H2a*) foram desenhados usando-se o programa Primer Express (Applied Biosystem) ou Primer 3 a partir de sequências obtidas do banco de dados do GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) ou da TIGR (www.tigr.org) (Tabela 2). A eficiência dos *primers* para cada reação foi determinada pelo *software* LinRegPCR e considerada no cálculo da quantificação relativa.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos específicos utilizados para o estudo dos genes em embriões bovinos, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no GenBank ou referência bibliográfica

Produto	Sequência (5'-3') do <i>primer</i>	Tamanho do produto (pb)	Nº de acesso no <i>genbank</i> ou ref. Bibliográfica
B- actina	F- 5' GACATCCGCAAGGACCTCTA 3' R- 5' ACATCTGCTGGAAGGTGGAC 3'	205	NM_173979
<i>DNAJB1</i>	F- 5' AGGACTGACCAGGGACCTTT 3' R- 5' AGACTGCATTGCCTTTGCTT 3'	220	NM_001033763.1
<i>HSF1</i>	F- 5' ACTCCAACCTGGACAACCTG 3' R- 5' TGAGTCTGGGCTGCTTTTCT 3'	209	NM_001076809.1
<i>HSPA1L</i>	F- 5' CACTGTGCCAGCCTACTTCA 3' R- 5' CACATCAAATGTGCCTCCAC 3'	190	NM_001167895.1
<i>HSF2</i>	F- 5' AGCAAAACATGCACAACAGC 3' R- 5' AAATCCGCTCCCTTGACTTT 3'	233	NM_001083405
<i>GLUT1</i>	F 5' CCAAGGATCTCTCAGAGCACAG 3' R 5' TTCTTCTGGACATCACTGCTGG 3'	110	Sagirkaya et al., 2007
<i>HSP27P1</i>	F- 5' AGCTGACGGTCAAGACCAAG 3' R- 5' GGGGACAGAGAGGAGGAGAC 3'	154	NM_001025569.1
<i>H2a</i>	F- 5' GCCATCCTGGAGTACCTCAC 3' R- 5' TGGATGTGTGGAATGACACC 3'	176	NM_174809

6.12 Análise quantitativa da expressão gênica em embriões bovinos

6.12.1 PCR em tempo real

A quantificação do cDNA foi realizada, utilizando-se metodologia de PCR em tempo real. Para as reações, utilizaram-se *kits* comerciais com SYBR Green (Power Sybr Green, Applied Biosystem), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação contendo 100 nM de cDNA, par de *primers*, Master Mix e 0,1 UI Taq DNA polimerase, em um volume final de 50 μ L, foi incubada a 95° C por 15 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95° C por 15 segundos, anelamento à temperatura específica para cada oligonucleotídeos (Tabela 3) por 15 segundos e extensão a 60°C por 45 segundos. Controles negativos foram preparados em que o RNA ou a enzima transcriptase reversa foram omitidos durante a reação de RT.

Tabela 3. Concentração de *primers*, temperatura de pareamento e temperatura de dissociação dos genes estudados nas condições padronizadas da PCR em tempo real.

Gene	cDNA (ng)	Temperatura de pareamento
B actina	400	53 ⁰ C
<i>DNAJB1</i>	450	55 ⁰ C
<i>HSF1</i>	450	55 ⁰ C
<i>HSPA1L</i>	450	55 ⁰ C
<i>HSF2</i>	450	55 ⁰ C
<i>GLUT1</i>	450	53 ⁰ C
<i>HSP27P1</i>	450	55 ⁰ C
<i>H2a</i>	400	52 ⁰ C

Foram feitas reações em duplicata para cada amostra (de todos os tratamentos e controle) das respectivas repetições, em placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seladas com filme adesivo

óptico (Applied Biosystems). As amostras foram então encubadas em termociclador Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

O cálculo da eficiência de cada reação foi obtido utilizando-se o *software LinRegPCR* (RAMAKERS *et al.*, 2003). Os valores logarítmicos de fluorescência em cada ciclo foram utilizados para a obtenção da inclinação da reta, calculada a partir de regressão linear simples, e para o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. Ao se fazer a análise de cada reação, somente os pontos com coeficiente de correlação entre 0,999 e 1 foram utilizados para o cálculo da eficiência. Dessa forma, foi possível obter a eficiência de cada reação individualmente (Tabela 4).

A quantificação foi realizada utilizando-se o método do Ct (cycle threshold) comparativo, com os resultados expressos relativos a genes de referência endógena e a um grupo controle. O Ct corresponde ao ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (threshold), servindo como base para comparação entre as amostras. O controle negativo das amostras não apresentaram cts.

Como a quantificação relativa se baseia na frequência relativa dos transcritos do gene alvo em relação a um gene de expressão constitutiva, foram amplificadas as sequências dos primers *BETA ACTINA* e *H2A*. A *BETA ACTINA* apresentou menor coeficiente de variação entre Cts (2,9%) e maior eficiência de reação ($1,79 \pm 0,14$) do que o *H2A* ($3,1\%$ e $1,56 \pm 0,05$, respectivamente) e foi utilizada como referência endógena. Como calibrador, foi utilizado o grupo de FIV.

Tabela 4. Eficiência média das amplificações obtidas por PCR em tempo real nas comparações entre os grupos FIV e Part com embriões de 8 células para cada gene utilizado para análise da expressão relativa.

GENE	Eficiência média FIV	Eficiência média Part
<i>DNAJB1</i>	2.00±0,03	1.90±0,03
<i>HSPA1L</i>	1.83±0,02	1.82±0,03
<i>HSF1</i>	1.82±0,01	1.74±0,01
<i>HSF2</i>	1.85±0,01	1.86±0,01
<i>HSP27</i>	1.84±0,00	1.86±0,00
<i>GLUT1</i>	1.79±0,02	1.85±0,02
<i>B ACTINA</i>	1.75±0,05	1.82±0,05
<i>H2a</i>	1.58±0,02	1.53±0,02

Valores de expressão relativa apresentados como média± EPM.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,5% e corados com brometo de etídio por 30 minutos, para a verificação dos tamanhos dos fragmentos, especificidade das reações e validação dos resultados obtidos pela PCR em tempo real. O gel foi submetido a uma voltagem de ± 130 Volts por ± 3 horas.

6.13 Fixação e preparo dos blastocistos para TUNEL

Blastocistos expandidos foram fixados em paraformaldeído e incubados para posterior avaliação do índice de apoptose. Resumidamente, os blastocistos com 192h pós- fecundação ou ativação, foram retirados das gotas de cultivo, lavados em gotas de BSA[®] (Sigma) (1mg/ml) acrescidos de DPBS[®]. Foram preparadas placas tipo NUNC[®] com 1ml de paraformaldeído, para onde os blastocistos foram transferidos e permaneceram por 25 minutos em temperatura de 8° C. Após esse período, os mesmos foram lavados em gotas de DPBS[®], acrescidos de PVA Cold (0,01g) e transferidos para criotubos com 500 μ l da mesma solução, identificados e armazenados na mesma temperatura.

Para a realização do TUNEL, foi utilizado o *Kit Promega*[®]. Os blastocistos foram retirados dos criotubos, lavados em gotas de BSA[®] (1mg/ml) acrescidos de DPBS[®] e permeabilizados em solução de 0,1% de Triton x 100[®] e novamente lavados em gotas de BSA[®] (1mg/ml), acrescidos de DPBS[®] e, posteriormente, passaram por gotas de tampão de equilíbrio. Em seguida, foram incubados em gotas de TUNEL em atmosfera umidificada, em estufa incubadora por um período 1 hora. Terminada essa etapa, foram lavados em gotas de SSC, corados com DAPI[®] (corante de epifluorescência) e, então, transferidos para lâmina e observados em microscópio de epifluorescência. Todo o procedimento foi realizado em ambiente escuro. Foram considerados TUNEL positivo (apoptóticos), cromatina condensada em agregados granulares, picnóticos ou múltiplos fragmentos dispersos dentro dos espaços celulares (Gomez *et al.*, 2009). O índice apoptótico foi calculado a partir da relação do número total de células e do número de células contendo corpos apoptóticos.

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação da clivagem, para a taxa de produção de blastocistos, para o número total de células embrionárias, para o número de células apoptóticas e para o índice apoptótico foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Student Newman Keuls. Os resultados do PCR em tempo real foram analisados pelo *software* REST® (PFAFFL *et al.*, 2002), usando-se teste aleatório de realocação fixa em combinações duplas. Considerou-se $P < 0,05$ como nível de significância.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da cinética do desenvolvimento embrionário foi realizada com 72hpfa. Os resultados obtidos mostram que não houve diferença na clivagem total e nas proporções de embriões com 2, 4 ou 8 células (Tab.5), evidenciando que embriões fecundados *in vitro* e partenogênicos possuem similar capacidade de desenvolvimento durante as divisões embrionárias iniciais. Esses dados estão de acordo com Paffoni *et al.* (2008), que não encontraram diferenças em seus estudos com embriões humanos. Os mesmos não encontraram diferenças significativas na cinética do desenvolvimento celular durante as primeiras clivagens (42-48 e 66-68hpfa). Tais resultados sugerem que as primeiras divisões celulares após a ativação do oócito é dependente principalmente do conteúdo herdado do oócito, com pouca influência espermática, uma vez que na partenogênese não há a participação do espermatozoide. Em contrapartida, Gómez *et al.* (2009a) encontraram diferença na taxa de desenvolvimento embrionário inicial de bovinos entre os embriões FIV e partenogênicos. Encontraram uma maior taxa de clivagem inicial nos embriões FIV. Essa diferença, segundo os autores, pode ser devida ao uso de um touro específico e/ ou devida à ausência do genoma paterno.

Tabela 5. Efeito da fecundação *in vitro* (FIV) e da partenogênese (Part) sobre a clivagem de zigotos bovinos nas primeiras 72h após a ativação.

Trat	N ⁰	Embriões 2 células (%)	Embriões 4 células (%)	Embriões 8 células (%)	Clivagem total (%)
Part	631	3,2±0,9 ^a	26,4±4,0 ^a	43,4±3,7 ^a	73,1±5,2 ^a
FIV	737	4,0±1,5 ^a	25,5±5,3 ^a	51,2±7,8 ^a	80,7±3,4 ^a

^a Valores com letras semelhantes sobrescritas na mesma coluna não diferem entre si por ANAVA (P<0,05). Valores são mostrados como média±EPM.

Após o período de 72hpfa, os embriões Part e FIV foram distribuídos de acordo com o estágio da divisão celular em embriões com menos de 8 células (<8cel) e embriões com 8 ou mais células (≥ 8 cel), a fim de se avaliar o potencial de desenvolvimento embrionário a partir desses estádios e do índice de apoptose. Observou-se que tanto nos Part como na FIV os embriões com desenvolvimento mais rápido, isto é, aqueles que conseguiram atingir estágio de 8 ou mais células até 72hpfa, produziram mais blastocistos no D7 e no D8 (Tab. 3) que os embriões que não alcançaram estágio de 8 células até 72hpfa, mostrando que embriões que possuem as clivagens iniciais mais rápidas alcançam estágio de blastocistos com maior eficiência do que os embriões com desenvolvimento mais lento, independentemente de terem sido fecundados *in vitro* ou ativados por partenogênese. Estudo anterior já havia mostrado que embriões fecundados *in vitro* que apresentam clivagens iniciais mais rápidas possuem maior competência de desenvolvimento (WARD *et al.*, 2001), o que poderia estar associado à melhor qualidade do material citoplasmático herdado do oócito, refletindo em ativação mais eficiente do genoma embrionário (MEIRELLES *et al.*, 2004). No presente estudo, verificou-se que embriões partenogenéticos com clivagens iniciais mais rápidas são mais competentes em se desenvolver *in vitro*, o que pode estar relacionado à herança citoplasmática materna de melhor qualidade nesses embriões partenogenéticos de 8 ou mais células, semelhantemente ao proposto para embriões fecundados *in vitro*.

Quando os resultados foram comparados entre os grupos Part e FIV, não se observou diferença na taxa de blastocistos no D7 e D8 a partir de embriões com menos de 8 células (Tab. 6), mostrando que o baixo potencial de desenvolvimento de embriões com menos de 8 células é similar em ambos os sistemas de ativação (espermática ou química). Por outro lado, o desenvolvimento dos embriões com 8 ou mais células até estágio de blastocistos no D7 foi maior para o grupo Part do que FIV, porém sem diferença no D8 (Tab. 6). A ausência de diferença entre as taxas de blastocistos no D8 entre FIV e Part, ao contrário do observado no D7, pode ser devido ao início do processo de degeneração dos blastocistos partenogenéticos, o que levou à redução de 10,8% na taxa de blastocistos no D8 (de 63,6% no D7 para 56,7% no D8) enquanto nos blastocistos FIV houve uma redução de apenas 2,8%.

A degeneração em embriões partenogenéticos é esperada com o seu envelhecimento, levando a uma menor viabilidade embrionária. Maior produção de

blastocistos pela partenogênese já foi relatada por alguns estudos (GÓMEZ *et al.*, 2009a, 2009b) enquanto outros não encontraram diferenças (LABRECQUE e SIRARD., 2011). Um dos fatores que pode estar associado a resultados contrastantes entre estudos é a fertilidade do touro usado no grupo FIV utilizado para comparação. Sabe-se que touros podem ser fonte de variação na clivagem e na produção de blastocistos (CAMARGO *et al.* 2002, WARD *et al.* 2002). Nesse caso, a presença ou a ausência de diferença entre embriões FIV e Part pode, em parte, ser devido à maior ou à menor fertilidade do sêmen. Independentemente disso, o resultado de produção de blastocistos do presente estudo não deve ser comparado com os encontrados na literatura, pois foram calculados para se avaliar o potencial de desenvolvimento dos embriões em estágio de 8 células, ao contrário dos publicados na literatura, em que se avaliam o potencial de desenvolvimento do zigoto.

Ao se reunir os resultados de clivagem de até 8 células, similar entre os grupos Part e FIV (Tab. 5), com os do desenvolvimento a partir de 8 células, em que a produção de blastocistos foi maior para o grupo Part do que para o FIV (Tab. 6), observa-se que diferenças no desenvolvimento embrionário pré-implantacional entre embriões Part e FIV ocorreu a partir do estágio de 8 células. Em bovinos, a ativação do genoma embrionário ocorre entre os estádios de 8-16 células, a qual é importante para o desenvolvimento posterior (SONG & WESSEL, 2005). As diferenças observadas a partir de estágio de 8 células podem estar associadas a alterações na ativação do genoma embrionário, o que provocaria alterações no padrão de expressão gênica dos embriões.

Tabela 6. Produção de blastocistos fecundados *in vitro* (FIV) ou partenogenéticos (Part) a partir de embriões com menos de 8 células (< 8cel) ou 8 células ou mais (≥8cel).

Trat	Estádio	N	Blastocistos D7 (%)	Blastocistos D8 (%)
Part	<8cel	190	28,1±3,0 ^c	23,8±4,4 ^b
	≥8cel	195	63,6±3,4 ^a	56,7±3,0 ^a
Fiv	<8cel	219	13,1±5,8 ^c	11,9±5,8 ^b
	≥8cel	289	45,3±8,9 ^b	44,2±8,9 ^a

^{a,b,c} Valores com diferentes letras sobscritas na mesma coluna diferem por ANAVA (P<0,05). Valores são mostrados como média±EPM.

A figura seguinte mostra que, apesar das diferenças na produção de blastocistos no D7, os embriões FIV e Part são iguais morfologicamente.

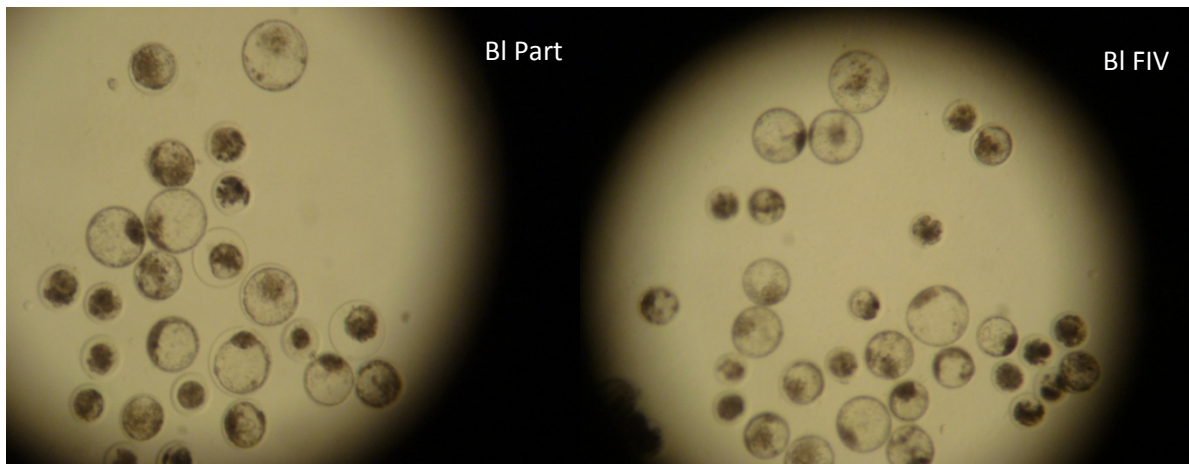


Figura 2. Blastocistos (BI) produzidos por FIV ou Part no D7.

Com o objetivo de se avaliar aspectos em nível celular dos blastocistos gerados a partir dos embriões com 8 ou mais células, analisou-se a quantidade total de células, de células apoptóticas e o índice de células apoptóticas nos blastocistos no D8. A Figura 3 mostra imagens ilustrativas de blastocistos analisados quanto à apoptose pela técnica de TUNEL. Não se observou diferença significativa nesses parâmetros entre os blastocistos Part e FIV (Tab. 7), apesar de o índice apoptótico ser numericamente superior no grupo Part, contrariando a expectativa de alterações em nível celular, caracterizando-se uma menor qualidade dos embriões Part. Esses resultados são semelhantes aos relatados por Gómez *et al.* (2009a), porém diferem dos relatados por Neuber *et al.* (2002), Hao *et al.* (2004) e Wang *et al.* (2008), que observaram diferenças no número de total de células e no índice de células apoptóticas. A ausência de diferença na qualidade celular observada no presente estudo pode ser devida à origem dos blastocistos analisados, em que foram considerados somente os blastocistos oriundos de embriões com 8 ou mais células, isto é, embriões que apresentaram elevado potencial de desenvolvimento, ao contrário dos trabalhos citados. Esse fato pode ter colaborado para que os blastocistos partenogênicos apresentassem maior quantidade de células, reduzindo as diferenças com os blastocistos FIV. Contudo, não se deve descartar possíveis diferenças entre a proporção de células apoptóticas entre a massa celular interna (MCI) e trofoblasto, uma vez que estudo de Gómez *et al.* (2009a) encontrou

maior índice de células apoptóticas na MCI de embriões partenogênicos do que de fecundação *in vitro*, apesar de não haver diferença no índice geral de células apoptóticas.

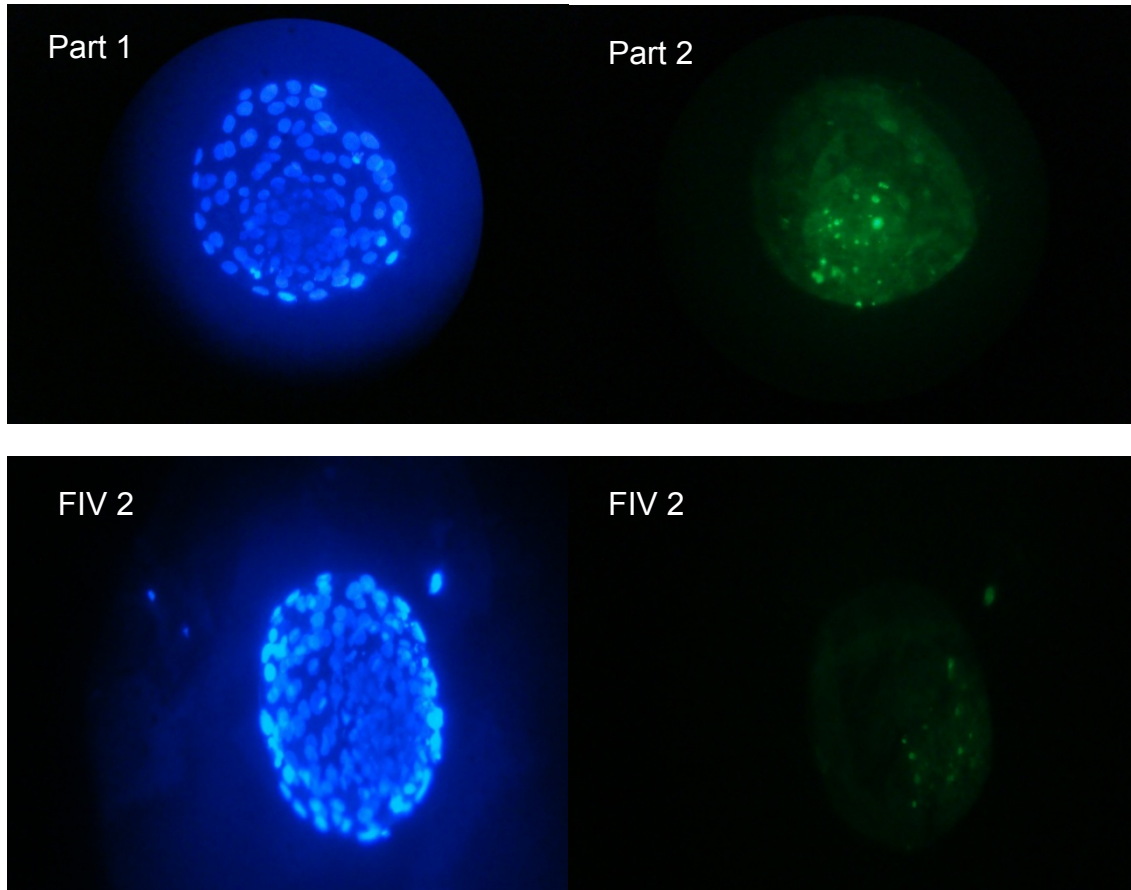


Figura 3. Imagens ilustrativas da detecção da fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL sob aumento de 1000X em blastocistos bovinos oriundos de fecundação *in vitro* (FIV) ou partenogênese (Part). As ilustrações FIV 1 e Part 1 são de blastocistos com blastômeros marcados pelo DAPI e visualizados em azul no filtro 460 nm. As ilustrações FIV 2 e Part 2 são de blastocistos com blastômeros corados pela fluoresceína visualizados em coloração verde no filtro 520±20 nm, indicando apoptose.

Tabela 7. Número total de células, de células apoptóticas e índice de apoptose em blastocistos produzidos por fecundação *in vitro* (FIV) ou partenogênese (Part) a partir de embriões com 8 ou mais células no D8.

Trat	N	Nº total de células (n)	Nº de células apoptóticas (n)	Índice apoptótico (%)
Part	51	92,0±3,4 ^a	10,8±1,22 ^a	11,4±1,27 ^a
Fiv	49	102,30±4,8 ^a	9,5±1,07 ^a	9,8±1,08 ^a

^a Valores com letras semelhantes sobrescritas na mesma coluna não diferem entre si por ANAVA (P<0,05). Valores são mostrados como média±EP.

Para se avaliar possíveis alterações em nível molecular, analisou-se a expressão gênica em embriões Part e FIV com 8 células. A escolha desse estágio para avaliação da expressão gênica se deve ao fato de ser o estágio onde se espera que ocorra a ativação do genoma embrionário e ao fato de o resultado anterior ter mostrado que diferenças no desenvolvimento entre embriões Part e FIV ocorrem a partir de 8 células.

Analisou-se por PCR em tempo real a expressão de seis genes, sendo cinco deles associados ao estresse (*DNAJB1*, *HSF1*, *HSPA1L*, *HSF2* e *HSP27P1*) e um ao consumo de glicose (*Glut1*). Os genes avaliados são de fundamental importância no processo de PIVE. Durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*, ocorrem diversas formas de estresse, e como estes genes codificam proteínas específicas de estresse, foram escolhidos para este estudo, pois os mesmos têm a função de proteger os embriões contra qualquer fator estressante a que eles possam ser submetidos.

Analisando-se as curvas de dissociação (Figuras 5 a 11) (Anexo) dos genes estudados, pode-se observar a ausência de picos referentes a produtos inespecíficos da PCR ou dímeros de *primers*, sendo essa ausência uma das condições necessária para a validação da quantificação de transcritos por PCR em tempo real, utilizando-se o corante *Syber Green*. Caso haja alterações no padrão das curvas de dissociação analisadas, os valores da quantificação podem estar

alterados levando a erros de interpretação, visto que esse corante tem a propriedade de se ligar a qualquer fita dupla de DNA.

Dos seis genes avaliados, cinco apresentaram diferente padrão de expressão nos embriões Part em relação aos embriões FIV (Fig. 12). Os genes *DNAJB1*, *HSF1* e *HSPA1L* apresentam-se subregulados enquanto o gene *HSF2* esteve sobrerregulado, enquanto que o *Glut 1*, gene de metabolismo celular, também se apresentou subregulado. Diferenças na expressão gênica entre embriões bovinos FIV e Part já foram identificados em outros estudos com embriões em estágio de blastocistos. Gómez *et al.* (2009a) encontraram diferenças na expressão de genes associados ao metabolismo, à formação de blastocistos, à pluripotência, à apoptose e ao reconhecimento da gestação em blastocistos expandido no oitavo dia após a ativação. Nowak-Imialek *et al.* (2008) observaram diferença no padrão de expressão de genes associados a histonas em blastocistos.

O presente estudo mostrou que diferenças no padrão de expressão gênica ocorrem também em estádios de 8 células, o que pode influenciar o desenvolvimento embrionário posterior. O padrão de expressão diferente pode estar associado à conformação da cromatina durante a fase de ativação do genoma embrionário. Nowak-Imialek *et al.* (2008) analisando o padrão de expressão do gene histona lisina metiltransferase (SUV39H1), encontraram uma sobreexpressão desse gene nos embriões bovinos com 8-16 células partenogênicos, sugerindo uma assimetria no padrão de metilação de histona H3 na lisina 9 entre embriões FIV e Part. Como a função enzimática da SUV39H1 envolve a formação de sítios de ligação para a proteína heterocromatina 1 (HP1), a qual é essencial para a formação da heterocromatina e do silenciamento gênico (AAGAARD *et al.*, 2000), a sobreexpressão do gene com consequente expressão da proteína poderia levar à alteração da expressão gênica, com redução dos níveis de alguns transcritos, como o *HSF1*.

Por outro lado, Bui *et al.* (2011) observaram em camundongos que a presença da cromatina paterna é importante para regular a atividade transcricional durante a fase de pre-implantação e envolve a presença de espermatozoide. Os mesmos relataram que a produção de novos RNAs é reprimida nos embriões gerados por injeção espermática citoplasmática, mas é mantida em partenogênicos durante a transição de duas para oito células, coincidindo com a fase da ativação do genoma embrionário nessa espécie. Nesse caso, seria esperada

uma maior quantidade de transcritos nos embriões partenogênicos, o que não foi o caso do gene *HSF1*, que se apresentou sub-regulado nos embriões Part. Contudo, o gene *HSF2* apresentou uma quantidade de transcritos seis vezes maior nos embriões Part do que nos de FIV. Se a presença da cromatina paterna for importante para reprimir a formação de novos RNAs, não é claro se esse papel será igual para todos os genes.

É possível que a assimetria da estrutura da cromatina, com ausência da cromatina partena, nos embriões Part com oito células também influencie a expressão dos outros genes alterados, no caso *DNAJB1* e *HSPA1L*. Contudo, é mais provável que a menor expressão dos genes *DNAJB1* e *HSPA1L* seja resultado da menor expressão da *HSF1*.

A *HSPA1L*, também chamada de HSP70.1L, é uma chaperona variante da HSP70.1^a, com a função de proteção proteica, suprime a agregação de proteínas desnaturadas causadas por condições estressantes (PATTERSON; HOHPED, 2006). A *DNAJB1* é uma proteína de choque térmico que tem ação sinérgica com as HSP70 na resposta ao estresse, proporcionando maior proteção celular (OHTSUKA & SUZUKI, 2000). A *HSF1*, assim como a *HSF2*, é um fator de transcrição que regula a expressão de desses genes HSPs (*TRINKLEIN et al.*, 2004). Contudo, a ação da *HSF2* depende do *HSF1*, uma vez que ela somente é recrutada ao promotor do HSP na presença de *HSF1* (*ÖSTLING et al.*, 2007). Assim, a menor expressão do *HSF1* pode ter levado à menor expressão da *DNAJB1* e *HSPA1L*. Como a *HSF2* modula a expressão das HSPs (*MEZGER et al.*, 1991; *MORIMOTO et al.*, 1994; *WU.*, 1995) de forma dependente do *HSF1* (*ÖSTLING et al.*, 2007), mesmo uma maior expressão da *HSF2* não teria um efeito sobre a expressão das HSPs, uma vez que a quantidade de transcritos de *HSF1* estava reduzida nos embriões Part. No entanto, não se tem uma visão clara se a *HSF2* pode modular tanto negativamente como positivamente a transcrição das HSPs (*MURPHY et al.*, 1994; *MEZGER et al.*, 1989; *KOTHARY et al.*, 1987; *GIEBEL et al.*, 1988; *LEGAGNEUX et al.*, 1989).

Como exemplo, a sobreexpressão da isoforma *HSF2* beta em células K562 (células imortalizadas de leucemia eritromieloblastóide humana), tratadas com agente indutor de diferenciação (hemim), previne a ativação do promotor de HSPs, ao contrário da isoforma *HSF2* alpha (*LEPPÄ et al.*, 1997). Contudo, em bovinos,

essas isoformas não estão ainda caracterizadas, não havendo como distingui-las no presente experimento.

Outro fator que pode contribuir para a detecção de menor quantidade de transcritos de *DNAJB1* e *HSPA1L* é a ausência da fecundação espermiática, uma vez que transcritos desses genes são encontrados em espermatozoides e poderiam ser entregues aos oócitos no momento da fecundação (OSTERMIEIER *et al.*, 2004). Contudo, deve-se levar em conta que a quantidade de transcritos em espermatozoides mamíferos é baixa, estimada entre 10 e 20 fg/espermatozoide humano (DADOUNE, 2009), o que deve pouco influenciar na quantidade total de RNA em embriões nos estádios iniciais de desenvolvimento.

As HSPs atuam, não somente em condições de estresse, mas também na regulação da homeostasia celular, mesmo na ausência de agente estressor (RUPIK *et al.*, 2011). A inibição da HSPs, como a HSP70, reduz o desenvolvimento pré-implantacional de embriões de camundongos (MATWEE *et al.*, 2001; ESFANDIARI *et al.*, 2007). A expressão das HSP no período pós-implantacional também é importante. Em gestações de camundongos, observou-se a expressão de chaperonas da família das HSP70 nos tecidos extraembrionários a partir de E8.5 e nos embriões, a partir de E15.5. A expressão das isoformas de HSP90 também foram observadas em embriões de camundongos nos estádios de 8 células e de blastocistos (revisado por RUPIK *et al.*, 2011). Portanto, a manutenção de níveis constitutivos de HSP parece ser necessária para o adequado desenvolvimento embrionário. A menor expressão dos genes que codificam proteínas *heat shock* (*DNAJB1* e *HSPA1L*) da família da HSP70) nos embriões Part sugere que a manutenção da homeostasia pode estar comprometida e prejudicar a viabilidade desses embriões. De fato, é bem estabelecido que gestações de embriões partenogênicos em mamíferos não chegam a termo por deficiência de genes imprintados, mas, curiosamente, no presente experimento, os embriões Part em estágio de blastocistos não apresentaram diferenças em nível celular com os embriões FIV em relação à apoptose, indicando que as grandes diferenças de viabilidade devem ocorrer após essa fase. Além disso, embriões cultivados *in vitro* estão expostos a agentes estressantes causados pelas condições de cultivo inadequadas (FERNÁNDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2007, DAS e HOLZER, 2012), o que pode requerer a proteção de chaperonas (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2007,

ESFANDIARI *et al.*, 2007), ressaltando a importância da expressão de genes de HSPs.

A hipótese quanto à maior expressão do GLUT1 nos embriões FIV em relação aos Part seria o aumento na glicólise associado com a penetração do espermatozoide no oócito (URNER e SAKKAS., 1996; BIGGERS *et al.*, 1967). O catabolismo aumentado da glicose ocorre somente durante a fertilização. O mesmo não é observado após a ativação partenogénica (URNER e SAKKAS., 1999). Urner e Sakkas (1999) encontraram aumento significativo de glicose no oócito fertilizado (1Ca21) em comparação com os oócitos não fertilizados (2Ca21), indicando uma maior taxa de glicólise associada à fecundação. Portanto, os espermatozoides podem trazer um fator que estimula o metabolismo do oócito (PANTALEON *et al.*, 2001). Zigotos de ratos têm um requisito para a piruvato durante a primeira divisão, ao passo que, na segunda divisão, esse requisito é pelo piruvato e pelo lactato que agem sinergicamente (WALES e WHITTINGHAM, 1967). Já a glicose, torna-se o substrato preferido após a compactação, na fase de oito células (LEESE e BARTON, 1984), em que é necessário para alimentar a alta energia, necessitando da atividade de bombas de Na⁺ e K⁺ dependentes de ATPases para a formação da blastocelule.

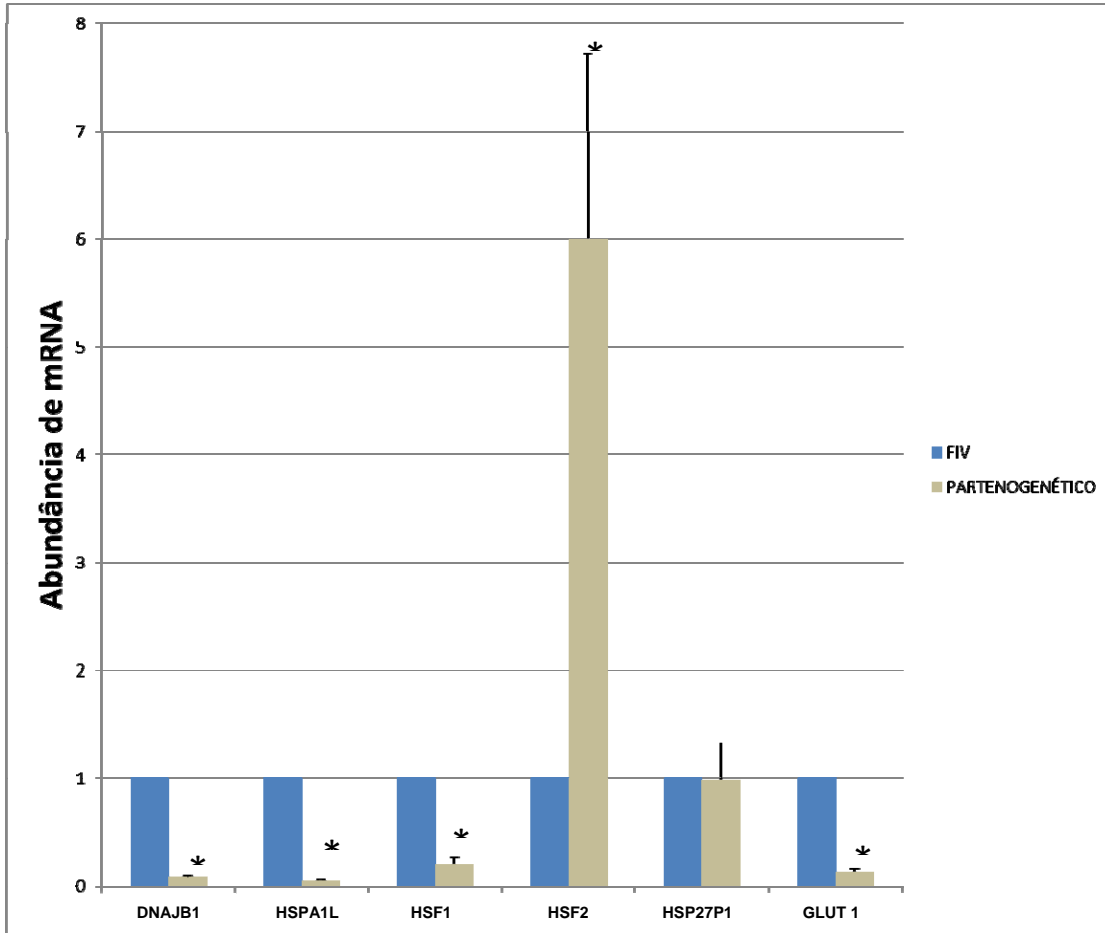


Figura 11. Quantificação de transcritos em embriões de 8 células produzidos por FIV ou Part. Colunas com asteriscos diferem dentro do mesmo gene ($P < 0,05$).

Os produtos amplificados foram analisados para a verificação dos tamanhos dos fragmentos, especificidade das reações e para a validação dos resultados obtidos pela PCR em tempo real. Todos os transcritos dos genes estudados foram identificados em gel de agarose e apresentaram o tamanho esperado como pode ser visto na figura abaixo.

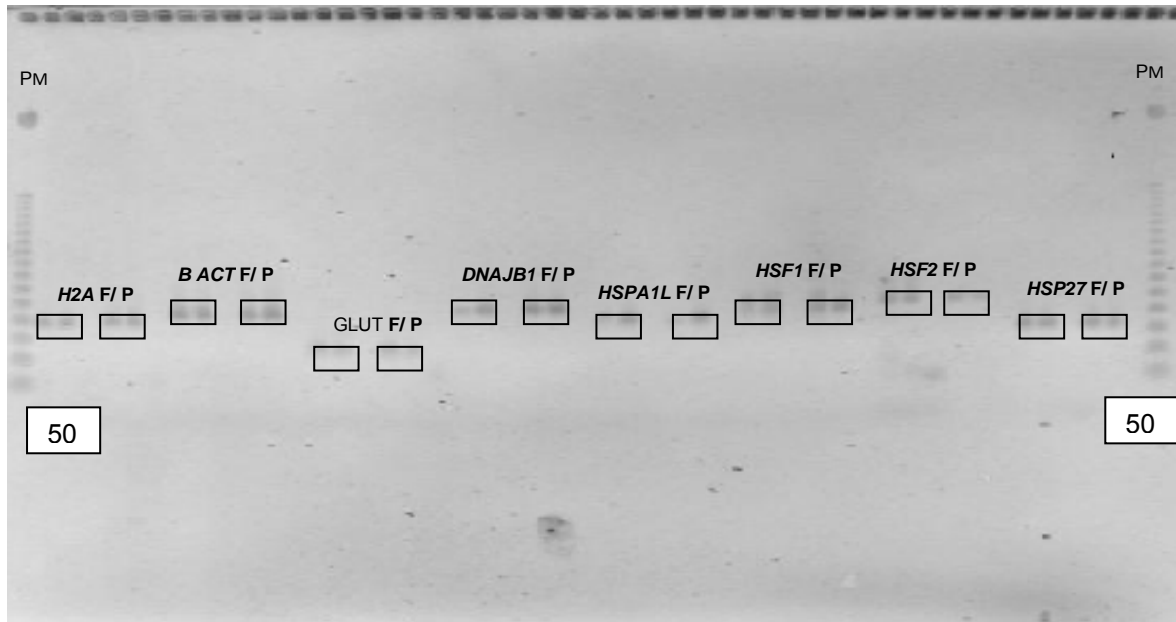


Figura 12. Gel de agarose para a verificação dos tamanhos dos fragmentos dos genes acima relacionados. Os marcadores (PM) utilizados foram de 50 pb. Os tratamentos visualizados foram F (FIV) e P (Part), respectivamente. Foram realizadas duplicatas e um controle negativo para cada gene. O número de pares de base de cada gene pode ser visualizado no quadro 1.

9 CONCLUSÕES

Conclui-se que embriões partenogênicos de 8 células possuem alterações no padrão de expressão gênica em relação aos embriões FIV, porém o seu desenvolvimento até estágio de blastocistos é superior, sem influenciar no total de células e no índice de apoptose. Tais diferenças devem ser levadas em consideração na interpretação de resultados de estudos com embriões partenogênicos em substituição aos embriões FIV.

REFERÊNCIAS

AAGAARD, L. et al. Mitotic Phosphorylation of SUV39H1, a Novel Component of Active Centromeres, Coincides with Transient Accumulation at Mammalian Centromeres. **J. Cell Sci.**, Great Britain, v.113, n. JCS0901, p. 817-829, feb/2000.

ALEXANDRE, S. et al. Detection of Apoptosis Induced by Topoisomerase Inhibitors and Serum Deprivation in Syrian Hamster Embryo Cells. **Experimental cell research**, v. 255, p. 30-39, feb/2000.

ANGUITA, B. et al. Effect of Oocyte Diameter on Meiotic Competence, Embryo Development, p.34 (cdc2) Expression and MPF Activity in Prepubertal Goat Oocytes. **Theriogenology**, v. 67, p. 526-536, feb.2007.

ARAÚJO, C. H. M., et. al., Gametogênese: estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana. **Medicina**, Riberão Preto, v.40, n. 4, p. 551-5558, out/dez 2007.

ARTLEY, J.K.; BRAUDE, P.R. Biochemistry of the Preimplantation Embryo. **Assit reprod**, v.3, p. 13- 32, 1993.

BALASUBRAMANIAN, S. et al. Expression Pattern of Oxygen and Stress-Responsive Gene Transcripts at Various Developmental Stages of In Vitro and In Vivo Preimplantation Bovine Embryos. **Theriogenology**, v.15, n.68, p.265-275, jul.2007.

BARNES, F. L. et al Embryo Cloning in Cattle: the Use of In Vitro Matured Oocytes. **Journal of Reproduction and fertility**. Cambridge, v. 97, p. 317-320, 1993.

BAVISTER, B.D.; ROSE-HELLEKANT, T.A.; PINYOPUMMINTR, T. Development of In Vitro Mature In Vitro Fertilized Bovine Embryos into Morulae and Blastocysts Culture Media. **Theriogenology**, v. 37, p. 127-146, 1992.

BETTERIDGE, K.J. A History of Farm Animal Embryo Transfer and Some Associated Techniques. **Animal Reproduction Science**, v.79, p. 203–244, dec.2003.

BEDFORD, J.M. An Electron Microscopy Study of Sperm Penetration Into Rabbit Egg After Natural Mating. **Am J Anat**; v. 133, p. 213-254, feb.1972.

BESSA I. R. **Perfil da expressão de genes candidatos para a aquisição da competência durante o crescimento ovocitário em bovinos** 2011. 71f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

BIGGERS, J.D.; WHITTINGHAM, D.G.; DONAHUE, R.P. The Pattern of Energy Metabolism in the Mouse Oocyte and Zygote. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 58, p.560–567, aug.1967.

BLAKEWOOD, E.G.; ZHANG, L. The Use of Chick Embryo Amniotic Fluids for the *In Vitro* Culture of Early Stage Mammalian Embryos. **Theriogenology**, v.39, p.189, jan.1993.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and Follicular Morphology as Determining Characteristics for Developmental Competence in Bovine Oocytes. **Molecular reproduction and development**, v.41, p. 54-62, may 1995.

BOEDIONO, A., SUZUKI, T., LI, L.Y., GODKE, R.A. Offspring Born from Chimeras Reconstructed from Parthenogenetic and In Vitro Fertilized Bovine Embryos. **Molecular Reproductive Development**, v.53, p.159-170, jun.1991.

BOERKE, A.; DIELEMAN, S.J.; GADELLA, B.M. A POSSIBLE ROLE FOR SPERM RNA IN EARLY EMBRYO DEVELOPMENT. **Theriogenology**, v. 68, p. 147-155, sept.2007.

BRACKETT, B. C. et al. Normal Development Following *In Vitro* Fertilization in the Cow. **Biology of Reproduction**, Pennsylvania, v. 27, n.1, p. 147-158, aug.1982.

BREVINI, G. T.; GANDOLFI, F. The Maternal Legacy to the Embryo: Cytoplasmic Components and Their Effects on Early Development. **Theriogenology**, v.55, n.6, p.1255-1276, apr.2001.

BRITTO VELHO, F. A. de. **Avaliação da expressão gênica e da maturação nuclear *in vitro* em complexos cumuli- oócitos bovinos**, 2011.41f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2011.

BUI, H.T. et al. Essential Role of Paternal Chromatin in the Regulation of Transcriptional Activity During Mouse Preimplantation Development. **Reproduction**, v.141, n.1, p. 67-77, jan/2011.

BYRNE, T.J. et al. Analysis of Apoptosis in the Preimplantation Bovine Embryo Using TUNEL, **J. Reprod., Fertil.** v.117, p. 97-105, sept.1999.

CAGNOTO, D. G. et al. Morfologia e desenvolvimento ultraestrutural do sistema renal de embriões bovinos com idade gestacional entre 10 e 50 dias. **Ciência Rural**, v.39, n.7, p.2154-2161, oct.2009.

CALDER, M. S. et al. Responsiveness of. Bovine Cumulus – Oocyte – Complexes (COO) To Porcine and Recombinant Human FSH, and the Effect of COC Quality on Gonadotropine Receptor and CX 43 Marker Gene mRNAs During Maturation In Vitro. **Reprod. Biol. Endocrinol.**,v.1, p. 14, feb.2003.

CAMARGO, L.S.A. et al. Factors Influencing In Vitro Embryo Production. **Animal reproduction**, v.3, n.1, p. 19-28, jan/mar.2006.

CAMARGO, L.S.A. et al. Efeito de concentração espermática e período de incubação oócito- espermatozoide na fecundação *in vitro* em bovinos da raça Gir. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.37, p.709-715, may 2002.

CAMPANHA, B. C. S. **Derivação de células tronco- embrionárias, com a utilização de inibidores MEK 1 e GSK3, a partir de embriões de camundongo ativado partenogeneticamente.** UNESP- Assis-SP. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/13003/derivacao-celulas-tronco-embrionarias-utilizacao/>> Acesso em 11 ago. 2012.

CARVALHO NETO, J.O. **Avaliação da qualidade do espermatozoide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção *in vitro* de embriões,** 2009. 91f. (Dissertação Mestrado) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

COELHO, L. de A. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: Utilização de diferentes fontes de gonadotrofinas na maturação dos oócitos R. **Bras. Zootec.**, v.31, n.3, p.1117-1121, fev.2002.

COELHO, E.R.; et al Metabolismo embrionário no período de pré- implantação. **FEMINA**, Rio de Janeiro, v. 34, n.8, p.551-557, ago.2006.

CROZET N.; DAHIREL M.; GALL L. Meiotic Competence of In Vitro Grown Goat Oocytes. **J Reprod. Fertil.** v. 118, p. 367-373, mar.2000.

CROZET, N.; MOTLIK, J.; SZOLLOSI, D. Nucleolar Fine Structure and Rna Synthesis in Porcine Oocytes During the Early Stages of Antrum Formation; **Biol.Cell.** ,v.41, p.35-42, 1981.

DADOUNE, J.P. Spermatozoa Rnas: What About their Functions? **Microsc Res Tech.** v.72, n.8, p.536-551. aug.2009.

DAS, M.; HOLZER, H.E. Recurrent Implantation Failure: Gamete and Embryo Factors. **Fertil Steril.** v.97, n.5, p.1021-1027, May 2012.

DENG, M.Q.; SHEIN, S.S. A Specific Inhibitor of P32(Cdc2)/Cyclin B Suppresses Fertilization- Induced Calcium Oscillations Mouse Eggs. **Biol. Reprod.** v.62, p. 873-878, 2000.

DE SOUSA, P.A.; SILVA, S.J.M.; ANDERSON, R.A. Neurotrophin Signaling in Oocyte Survival and Developmental Competence: A Paradigm for Cellular Totipotency. **Cloning Stem Cells**, v.6, n.4, p.375-385, dec.2004.

DIELEMAN, S.J. et al. Effects of In Vivo Prematuration and In Vivo Final Maturation On Developmental Capacity and Quality of Pre-Implantation Embryos. **Theriogenology**, v.57,n.1, p. 5-20, jan. 2002.

DIESEL, T. O. **Efeito da estimulação ovariana na quantidade e qualidade de ovócitos obtidos por aspiração folicular transvaginal em novilhas Nelore.** 2010, 81f. Dissertação (Mestrado) Medicina Veterinária. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2006, Araxá. **Anais...**,Araxá: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2006. p. 115-130.

DUBEY, A. et al. Failed Fertilization after Intracytoplasmic Sperm Injection: The Extent of Paternal and Maternal Chromatin Decondensation. **Fertil. Steril.** v. 68, n.4, p. 714-717, 1997.

DUMONT, J. et al. p90Rsk is Not Involved In Cytostatic Factor Arrest In Mouse Oocytes. **J Cell Biol**, v.169, n.2, p.227-231, apr.2005.

EDWARDS, R.G. Maturation *In Vitro* of Mouse, Sheep, Cow, Pig, Rhesus Monkey and Human Ovarian Oocytes. **Nature**, London, v.208, n.5008, p.349-351, oct.1965.

ESFANDIARI, N. et al. Heat- Shock Proteins Modulate the Incidence of Apoptosis and Oxidative Stress in Preimplantation Mouse Embryos. **Fertil Steril**, v.87, n.5, p.1214-1217, may 2007.

FEHILLY, C.B.; WILLADSEN, S.M.; TUCKER, E.M. Experimental Chimerism in Sheep. **J Reprod Fertil**, v.70, n.1, p.347-351, jan.1984.

FEHRENBACH, E.; NIESS, A. Role of Heat Shock Protein in the Exercise Response. **Exercise Immunology Review**, v.5, p.57-77, 1999.

FERNÁNDEZ-GONZALEZ, R. et al. Suboptimal In Vitro Culture Conditions: An Epigenetic Origin of Long- Term Health Effects. **Mol Reprod Dev.**,v.74, n.9, p.1149-1156, sep.2007.

FINK, AL. Chaperone- Mediated Protein Folding. **Physiological reviews**, U.S.A, v. 79, n. 2 p. 425-449, apr.1999.

FIORENZA M. T. et al. Complex Expression of Murine Heat Shock Transcription Factors Nucleic Acids. **RES.** v. 23, n.3, p.467-474, feb.1995.

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

FRAZÃO, Alexandre Gonçalves. A fertilização in vitro: uma nova problemática jurídica. **Jus Navigandi**, Teresina, v 5, n. 42, jun. 2000 . Disponível em: <<http://jus.com.br/revista/texto/1850>>. Acesso em: 20 set. 2012.

FREITAS, V.J.F. et al. Estado da arte na produção de caprinos transgênicos e clonados. **Acta Scientiae Veterinary**, v.35, n.3, p.899-904, 2007b.

FREITAS, V.J.F. Transgênese em caprinos. In: FREITAS, V.J.F. (Ed.). **Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)**. Fortaleza: Multicor, 2006. p.61-70.

FRYDMAN, J.; HARTL, F.U. Molecular Chaperone Functions of Hsp70 and Hsp60 in Protein Folding. In: MORIMOTO R.I., TISSIÉRES A., GEORGOPOULOS C. **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones**. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1994. p. 251-283.

FUKUI, Y. et al. Parthenogenetic Development of Bovine Oocytes Treated with Ethanol and Cytochalasin B after In Vitro Maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.33, p.357–362, nov.1992.

GABAI, V. L. et al. Interplay Between Molecular Chaperones and Signaling Pathways in Survival of Heat Shock, **Journal of Applied Physiology**, v. 92 n.4, p.1743-1748, apr. 2002.

GALBINSK, S. **Viabilidade e fertilização *in vitro* dos oócitos bovinos após vitrificação em solução 6 m de DMSO**, 2001. Dissertação (mestrado) (Programa de pós- graduação em Medicina: clínica médica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Porto Alegre, 2001.

GANDOLFI, F.; MOOR, R.M. Stimulation of Early Embryonic Development in The Sheep By Co- Culture with Oviduct Epithelial Cells. **J Reprod Fertil**, v.81, n.1, p.23-28, sep.1987.

GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R.; Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1, 2004, Londrina,PR. **Anais...Londrina**, 2004.

GAUTIER, J.; MALLER, J.L. Cyclin B in Xenopus Oocytes: Implications for the Mechanism of Pre-MPF Activation **Embo J**. U.S.A, v.10, n.1, p. 177-182, jan.1991.

GEWIES, A. Introduction to Apoptosis. **Apo Review**, v. 1-26, 2003.

GIEBEL LB, DWORNICZAK BP, BAUTZ EK. Developmental Regulation of a Constitutively Expressed Mouse mRNA Encoding a 72-kDa Heat Shock- Like Protein. Federal Republic of Germany. **Dev Biol**. v, 125. n, 1. p, 200- 207, jan/ 1988.

GOMES, D. Células- tronco embrionárias: implicações bioéticas e jurídicas. Artigo de revisão. **Centro Universitário São Camilo**, v.1, n.2, p.78-87, 2007.

GÓMEZ, E. et al. Gene Expression in Early Expanded Parthenogenetic and In Vitro Fertilized Bovine Blastocysts. **J Reprod Dev**. v.55, n.6, p.607-614, dec.2009b.

GÓMEZ, E. et al. Biological Differences Between In Vitro Produced Bovine Embryos and Parthenotes. **Reproduction**, v.137, n.2, p.285-295, feb .2009a.

GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L. Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p.195-226.

GONÇALVES, P.B.D. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Rev Bras Reprod Anim.** , Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, abr/jun.2007.

GOODHAND, K.L. et al. In Vivo Oocyte Recovery and In Vitro Embryo Production from Bovine Donors Aspirated At Different Frequencies or Following FSH Treatment. **Theriogenology**, v. 51, n.5, p. 951-961, apr.1999.

GOODSON, M.L.; et al. Tissue- Dependent Expression of Heat Shock Factor 2 Isoforms with Distinct Transcriptional Activities. **Mol. Cel. Boil.** v.15, p. 5288-5293, 1995.

GORDON I. Oocyte Recovery and Maturation. *In*: Gordon I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p.30-65.

GORDON I. Problems and Prospects in Cattle Egg Transfer. **Ir Vet J**, v.29, n.3, p.39-62, mar.1975.

GORDON, A. C. et al. Intracellular Calcium Oscillations Signal Apoptosis Rather Activation In Vitro Aged Mouse Eggs. **Biology of Reproduction**, Champaign, n.66, p. 1828-1837, jun.2002.

GRUPEN, C. G.; NOTTLE, M. B.; NAGASHIMA, H. Calcium Release at Fertilization: Artificially Mimicking the Oocytes Response to Sperm. **Jornal of Reproduction and Development**, v. 48, n. 4, 2002.

GUERRA, M.D. **Reprodução feminina: fisiologia do hipotálamo, hipófise e ovário**. Juiz de Fora: Editar, 2001.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.

HAJNÓCZKY, G.; DAVIES, E.; MADESH, M. Calcium Signaling and Apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 304, n.3, p.445-454, may 2003.

HAN, S. I.; CONTI, M.; New Pathways from PKA to the Cdc2/Cyclin B. Complex in Oocytes wee 18 As a Potential PKA Substrate. **Cell Cycle**, v. 5, n.3, p. 227-231, 2006.

HANDYSIDE, A.H.; HUNTER, S. Cell Division in the Mouse Blastocyst Before Implantation. **Roux's Arch. Dev. Biol.**, v. 195, n.8, p. 519-526, oct.1986.

HAO, Y. et al. Apoptosis in Parthenogenetic Preimplantation Porcine Embryos. **Biology of Reproduction**. v. 70, n.6, p. 1644-1649, jun/2004.

HARDY, K. Apoptosis in the Human Embryo. **Rev. Reprod.** London, v. 4, n.3, p. 125-134, sept.1999.

HARRIS A. L. **Institute for Genomic Biology**: University of Illinois at Urbana Champaign, 1201. West Gregory Drive: Urbana, IL, 2009.

HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; THOMPSON, J.G. Redox regulation of early embryo development. **Reproduction**, v.123, n.4, p.479–486, apr.2002.

HAMATANI, T. et al. Dynamics of Global Gene Expression. **Changes during mouse preimplantation development development cell**, v.6, p. 117-131, 2004. Disponível em: [http://www.cell.com/development-cell/abstract/S1534-5807\(03\)00373-3](http://www.cell.com/development-cell/abstract/S1534-5807(03)00373-3). Acesso em: 18 ago. 2012.

HANADA, A.; ENYA, Y.; SUZUKI, T. Birth of Calves By Non- Surgical Transfer of In Vitro Fertilized Embryos Obtained from Oocytes Matured In Vitro. **Jpn J Reprod**, v.32, p.208, 1986.

HANSEN, P. J. Embryonic Mortality in Cattle from the Embryo's Perspective. **J. Anim. Sci.**, v. 80, n.2, p. 33-44, jan.2002.

HARTL, F.U.; HAYER-HARTL, M. Molecular Chaperones in the Cytosol: From Nascent Chain to Folded Protein. **Science**, v. 295, n.5561, p.1852–1858, mar.2002.

HEIKKILA, J.J. Heat Shock Gene Expression and Development II. An Overview of Mammalian and Avian Developmental System. **Dev. Genet.**, Ontário, v.14, n.2, p.87-91, 1993.

HIPP, J.; ATALA, A. Tissue Engineering, Stem Cells, Cloning, and Parthenogenesis: New Paradigms for Therapy. **J Exp Clin Assist Reprod**. v.1, n.1, p.3, dec.2004.

HOVING, S.; et al. Preparative Two- Dimensional Gel Electrophoresis at Alkaline Ph Using Narrow Range Immobilized Ph Gradients. **Proteomics**, v.2, n.2, p.127-134, feb.2002.

HURWITZ, A.; ADASHI, E. Y. Ovarian Follicular Atresia as an Apoptotic Process: A Paradigm for Programmed Cell Death in Endocrine Tissues. **Molecular and cellular endocrinology**, Baltimore, v. 84, n.1-2, p. 19 – 23, mar.1992.

HYTTEL, P. et al. Oocyte Growth, Capacitation and Final Maturation in Cattle. **Theriogenology**, v.47, n.1, p. 23-32, jan.1997.

INOVE, M.; NAKAYAMA, T.; SATO, E. Mitogen Activated Protein Kinase Translocation Into the Germinal Vesicle and Induces Germinal Vesicle Breakdown in Porcine Oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 58, n.1, p.130-136, jan.1998.

IRITANI, A., NIWA, K. Capacitation of Bull Spermatozoa and Fertilization In Vitro of Cattle Follicular Oocytes Matured in Culture. **J. Reprod. Fertil.** v.50, n.1, p. 119–121, may 1977.

JACOBSON, M.D.; WEIL, M.; RAFF, M.C. Programmed Cell Death in Animal Development. **Cell**. v.88,n.3, p.347–354, feb.1997.

JANSSENS, R.M. et al. Dose- Finding Study of Triptorelin Acetate for Prevention of a Premature LH Surge in IVF: A Prospective, Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Study. **Hum Reprod**, v.15, n.11, p.2333–2340, nov.2000.

KANO, F. et al. MEK and Cdc2 Kinase are Sequentially Required for Golgi Disassembly in MDCK Cells By the Mitotic Xenopus Extracts. **I Cell Biol.** Okazaki, v.149, n.2, p.357-368, apr.2000.

KARJA, V. et al. Tumour- Infiltrating Lymphocytes: A Prognostic Factor of PSA-Free Survival in Patients with Local Prostate Carcinoma Treated By Radical Prostatectomy. **Anticancer res.**, v. 25,p. 4435-4438, 2005.

KIANG, J.G.; TSOKOS, G.C. Heat Shock Protein 70 Kda: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. **Pharmacol Ther.** Washington, v.80, n.2, p. 183–201, nov.1998.

KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.** St. Louis: Elsevier Academic Press, 2006. 337p.

Kothary R. et al. Cell- Lineage- Specific Expression of the Mouse Hsp68 Gene During Embryogenesis. **Dev Biol.** v, 21. n, 2. p, 342-348, jun. 1987.

KOTSUFI, F.H.; HKUBO, M.H.; HTOMINAGA, T.H. Effect of Interactions Between Granulosa and Thecal Cells on Meiotic Arrest in Bovine Oocytes. **J reprod. Fertil.**, v.100, n.1, p.151-156, jan.1994.

KOVALCHIN, J.T. et al. In Vivo Treatment of Mice with Heat Shock Protein, Gp96, Improves Survival of Skin Grafts with Minor and Major Antigenic Disparity. **Transplant Immunol.**, Farnington,v.15, n.3, p.179–185, jan.2006.

KOVO, M. et al. An Active Protein Kinase A (PKA) is Involved in Meiotic Arrest of Rat Growing Oocytes. **Society for reproduction and fertility**, Rehovot, v. 132, n.1, p. 33-43, jul.2006.

KRISCHEK, C.; MEINECKE B. In Vitro Maturation of Bovine Oocytes Requires Polyadenylation of mRNAs Coding Proteins for Chromatin Condensation, Spindle Assembly, MPF and MAP Kinase Activation. **Anim. Reprod. Sci**, Buenteweg, v. 73, n.3-4, p.129-140, oct.2002.

KRISHER, R.L. The Effect of Oocyte Quality on Development. **Journal Animal Science**, v.82, n.E14-26, p. 14-23, 2004.

KROEGER P. E.; SARGE K. D.; MORIMOTO R. I. Mouse Heat Transcription Factors 1 and 2 Refer a Trimeric Binding Site But Interact Differently with the HSP70 Heat Shock Element. **Mol cell. Biol.** v.13, p. 3370-3383, 1993.

KROEGER P. E.; MORIMOTO, R. I. Selection of New HSF1 and HSF2 DNA- Binding Sites Reveals Difference in Trimer Cooperativity. **Mol. Cel. Biol.** v.14, p. 7592-7603, 1994.

KUBELKA M. et al. Butyrolactone i Reversibly Inhibits Meiotic Maturation of Bovine Oocytes, Without Influencing Chromosome Condensation Activity. **Biology of Reproduction**; v.62, n.2, p.292-302, feb.2000.

KUBOTA H. et al. Identification Six Tcp-1 Containing Chaperonin. **Current biology** London, v.4, n.2, p. 89-99, feb.1994.

LALANCETTE, C. et al. Transcriptome Analysis of Bull Semen with Extreme on Return Rate: Use of Suppression Subtractive Hybridization to Identify Functional Markers for Fertility. **Biology of Reproduction**, v.78, p.618-635, nov.2007.

LEESE, H.J. Metabolic Control During Preimplantation Mammalian Development. **Hum Reprod Update**, Heslington, v.1, n.1, p.63-72, jan.1995.

LEESE, H.J.; BARTON, A.M. Pyruvate and Glucose Uptake By Mouse Ova and Preimplantation Mouse Embryos. **J Reprod Fertil**; v.72, n.1, p.9-13, sept.1984.

LEFEBVRE, C. et al. Meiotic Spindle Stability Depends on MAPK-Interacting and Spindle-Stabilizing Protein (MISS), a New MAPK Substrate. **J. Cell Biol.**, v.157, n.4, p.603-613, may 2002.

LEIVAS, F.G. **Influência da atmosfera gasosa e da fonte proteica sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* e taxa de prenhez em bovinos.** 2006 .Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria , 2006.

LEGAGNEUX V. et al. High Constitutive Transcription of HSP86 Gene in Murine Embryonal Carcinoma Cells. **Département de Biologie Moléculaire, Institut Pasteur**, Paris, v, 41. n, 1. p, 42-48, jul.1989.

LEPPÄ, S. et al. Overexpression of HSF2- Beta Inhibits Hemin- Induced Heat Shock Gene Expression and Erythroid Differentiation in K562 Cells. **J Biol Chem.**, v.13, n.24, p.15293-15298, jun.1997.

LEVY, R. et al. Annexin V Labelling and Terminal Transferase- Mediated DNA end Labelling. (TUNEL) Assay in Human Arrester Embryos. **Molecular human reproduction**. Lyon, v. 4, n.8, p. 775-783, aug.1998.

LIU, S. et al. Changes in the Distribution of Mitochondria Before and After In Vitro Maturation of Human Oocytes and the Effect of In Vitro Maturation on Mitochondria Distribution. **Fertility and Sterility**, Jinan, v.93, n.5, p. 1550-1555, mar.2009.

LIU, L.; TRIMARCHI, J. R.; KEEFE, D. L. Haploidy But Not Parthenogenetic Activation Leads to Increased Incidence of Apoptosis in Mouse Embryos. **Biology Reproduction**. v.66, n.1, p. 204-210, jan.2002.

LIU, Q. et al. Two Transcription Factors, DREB1 And DREB2, witch an EREBP/ AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Transduction Pathways in Drought and Low- Temperature- Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis. **The plant cell**. v. 10, n. 8, p.1391-1406, aug.1998.

LOI, P.; et al. Development of Parthenogenetic and Cloned Ovine Embryos: Effect of Activation Protocols. **Biology Reproduction**, Olmedo, v.58, n.5, p.1177-1187, may 1998.

LONGO, F.J. Fertilization: A Comparative Ultrastructural Review. **Biol Reprod**, v.9, n.2, p. 149-215, sept.1973.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In Vitro- Produced Bovine Embryos – Dealing with the Warts. **Theriogenology**, Dublin, v. 69, n.1, p. 17-22, jan.2008.

LONERGAN, P. et al. Effect of Culture Environment on Gene Expression. And Developmental Characteristics in IVF- Derived Embryos. **Theriogenology**, Dublin, v. 65, n. 1, p. 137-152, jan.2006.

LONERGAN, P et al. Factors Influencing Oocyte and Embryo Quality in Cattle. **Reprod Nurt Dev**, Newcastle, v.41, n.5, p. 427-437, sept/oct.2001.

LONERGAN, P. et al. Temporal Divergence in the Pattern of Messenger RNA Expression in Bovine Embryos Cultured from the Zygote to Blastocyst Stage In Vitro or In Vivo. **Biology of Reproduction**, Dublin, v. 69, n.4, p.1424–1431, oct.2003a.

LOCKE, M.; NOBLE, E.G. Stress Proteins: The Exercise Response. **Can. J. Appl, Physiol.** v.20, n.2, p. 155-167, jun.1995.

LU, K.H. et al. Pregnancy Established in Cattle By Transfer of Embryos Derived from In Vitro Fertilization of Oocytes Matured In Vitro. **Vet. Rec.**, v.121, n.11, p.259-260, sept.1987.

LU, C.Y.R. D.M. The Conserved Carboxyl Terminus and Zinc Finger- Like Domain of the Cochaperone Ydj 1 Assist Hsp70 in Protein Folding. **The Journal of Biological Chemistry**, Birmingham, v. 272, n. 10, p. 5970-5978, mar.1998.

MADGWICK, S.; JONES, K.T. How Eggs Arrest at Metaphase II: MPF Stabilisation Plus APC/C Inhibition Equals Cytostatic Factor. **Cell Div.** v. 26, n.2, p.4, jan.2007.

MATWEE, C. et al. The Effects of Antibodies to Heat Shock Protein 70 in Fertilization and Embryo Development. **Mol. Hum. Reprod.** , Guelph, v.7, n.9, p, 829–837, 2001.

MAKUCH, M. Y. **Vivências de mulheres e homens do programa de fertilização *in vitro* da UNICAMP.** 2001. Tese (Doutorado em Saúde Mental), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in Development. **Nature**, London, v. 407, n.6805, p. 796-801, oct.2000.

MEINECKE, B. et al Histone H1 and MAP Kinase Activities in Bovine Oocytes Following Protein Synthesis Inhibition. **Reprod Domest Anim**, Hannover, v.36, n.3-4, p.183-188, aug.2001.

MEIRELLES, F.V. et al. Genome Activation and Developmental Block in Bovine Embryos. **Animal Reproduction Science**, Pirassununga, v.82-83, p. 13-20, jul.2004.

MÉO, S.C., et. al. Parthenogenetic Activation of Bovine Oocytes Using Single and Combined Strontium, Ionomycin and 6-Dimethylaminopurine Treatments. **Zygote**, Nova Odessa, v.15, n.4, p. 195-306, nov.2007.

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

MEZGER V. et al. **Heat Shock Protein Synthesis in Preimplantation Mouse Embryos and Embryonal Carcinoma Cells**. Hightower H, Nover L, editors. Berlin: Springer, 1991.p.153-166.

MEZGER, V.; BENSUADE, O.; MORANGE, M. Unusual Levels of Heat Shock Element- Binding Activity in Embryonal Carcinoma Cells, **Mol. Cell. Biol.**, v.9, n.9, p.3888–3896, 1989.

MEZGER, V. et al. Detection of Heat Shock Element- Binding Activities By Gel Shift Assay During Mouse Preimplantation Development, **DEV. BIOL.**, v.165, p. 627-638, 1994.

MEYER, T.N.; DA SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. **Rev. Ass. Med. Brasil**, São Paulo, v.45, n.2, p. 181-188, apr/jun.1999.

MINOWADA, G. Clinical Implications of the Stress Response. **J Clin Invest.** v.95, n.1, p.3–12, jan.1995.

MITALIPOV, S.M.; NUSSER, K.D.; WOLF, D.P. Parthenogenetic Activation of Rhesus Monkey Oocytes and Reconstructed Embryos. **Bio Reprod**, Oregon,v.65, n.1, p. 253-259, jul.2001.

MORO, B. et al. Mechanism of Polar Body Formation in the Mouse Oocyte: On Interaction Between the Chromosomes, the Cytoskeleton and the Plasma Membrane. **J Embryol Exp Morphol**; v.92, p.11-32, mar.1986.

MOUNIER, N., ARRIGO, A.P. Actin Cytoskeleton and Small Heat Shock Proteins: How do they Interact, Cell Stress. **Chaperones**, v.7, n.2, p.167-176, apr. 2002.

MURPHY,S.P. et al. Characterization of Constitutive HSF2 DNA- Binding Activity in Mouse Embryonal Carcinoma Cells. **Mol Cell Biol.** v, 14. n, 8. p, 5309–5317, aug.1994.

MORIMOTO, R. I. et al. **Regulation of Heat Shock Gene Transcription By a Family of Heat Shock Factors**. New York: Spring Harbor Lab. Press, 1994. p.417-445.

NATHAN D. et al. The Role of Heat Shock Transcription Factor 1 in the Genome-Wide Regulation of the Mammalian Heat Shock Response. **Mol Biol Cell.** v.15, n.3, p.1254–1261, mar.2004.

NAVARA, C. S.; FIRST, N. L.; SCHATTEN, G. Microtubule Organization in the Cow During Fertilization Polyspermy Parthenogenesis, and Nuclear Transfer: The Role of the Sperm Aster. **Dev. Boil.** v.162, n.1, p. 29-40, mar.1994.

NEUBER, E. et al. Analysis of DNA Fragmentation of In Vitro Cultured Bovine Blastocysts Using TUNEL. **Theriogenology**. Beaverton, v.57, n.9, p.2193-2202, jun.2002.

NEUER, A. et al. The Role of Heat Shock Proteins in Reproduction. **Hum Reprod Update**. v.6, n.2, p. 149-159, 2000.

NEVES, M.F.T. **Caracterização das proteínas de choque térmico (HSP) nos testículos normais e criptorquídeos de canídeos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial)- Universidade de Trás- dos- montes e Alto Douro, Vila Real, 2010.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa, v.39, p.414-421, July 2010. Suplemento especial.

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**, Neustadt, v.53, n.1, p.21-34, jan.2000.

NOWAK-IMIALEK, M. et al. Messenger RNA Expression Patterns of Histone Associated Genes in Bovine Preimplantation Embryos Derived of Different Origins. **Molecular Reproduction and Development**, Neustadt, v.75, n.5, p.731-743, may 2008.

NUNES, D. S. R. et al. Fatores que interferem na qualidade oocitária e no número de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, 2010 (Resumo).

OHTSUKA K, SUZUKI T. Roles of Molecular Chaperones in the Nervous System. **Brain res. Bull**, v.53, n.2, p.141-146, sept.2000.

ORIÁ, M. O. B. & XIMENES, L. B. Casais inférteis diante da fertilização *in vitro*: o significado de vivenciar essa decisão. **Acta Paul. Enf**, São Paulo, v.17, n.3, p.278-285, abr. 2004.

SOULLIER, N. et al. Estimating the success of an in vitro fertilization programme using multiple imputation. **Human Reproduction**, v.23, n.1, p.187-192, jan.2008.

ORMED, M.G et al. Quantification of Apoptosis and Necrosis By Flow Cytometry. **Acta oncológica**, Surrey v.32, n.4, p.417-424, 1993.

OSTERMEIER, G.C. et al. Toward Using Stable Spermatozoal Rnas for Prognostic Assessment of Male Factor Fertility, **Fertil. Steril.** Detroit, Michigan, v.83, n.6, p. 1687-1694, jun.2005.

OSTERMEIER , G.C. et al. Reproductive Biology: Delivering Spermatozoan RNA to the Oocyte. **Nature**, London, v, 429, n.6988, p.154, may 2004.

ÖSTLING, P. et al. Heat Shock Factor 2 (HSF2) Contributes to Inducible Expression of Hsp Genes Through Interplay with HSF1. **J Biol Chem**. v. 282, n.10, p.7077–7086, mar.2007.

PAFFONI. A. et al. Pathenogenetic Activatio: Biology and Applications in the ART Laboratory. **Placenta**, v.29, n.2, p. 121-125, oct.2008.

PALMA, G.A. **Biotecnologia de La Reproducción**. Balcarce: INTA, 2001. 693p.

PANTALEON, M. et al. Glucose Transporte GLUT3: Ontogeny, Targeting and Role in the Mouse Blastocyst. **Proc Natl Acad Sci**, USA, v.94, n.8, p.3795-3800, apr.1997.

PANTALEON, M. et al. An Unusual Subcellular Localization of GLUT1 and Link with Metabolism in Oocytes and Preimplantation Mouse Embryos. **Biology of reproduction**, v. 64, n.4, p.1247–1254, apr.2001.

PAPA P. C. **Sensibilidade insulinica e conteúdo de glut 4 em camundongos obesos por tratamento com glutamato monossódico**. 1997. Dissertação (MESTRADO) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

PAPAIIOANNOU, V.E.; EBERT, K.M. Development of Fertilized Embryos Transferred to Oviducts of Immature Mice. **J Reprod Fertil**, v.76, n.2, p.603-608, mar.1986.

PARRISH JJ; Application of In Vitro Fertilization to Domestic Animal. IN WASSARMAN P.M (ED.); **Elements of mammalian fertilization**. Boca Raton: CRC PRESS, 1991.

PATTERSON, C.; HOHFELD, J. Molecular Chaperones and the Ubiquitin-Proteasome System. Protein Degradation: The Ubiquitin- Proteasome System . **Protein Degradation**, Weinheim, Wiley- VCH. v.2, p.1-30, 2005.

PAULA LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat Shock- Induced Apoptosis in Preimplantation Bovine Embryos is a Developmentally Regulated Phenomenon. **Biol Reprod**; v.66, n.4, p. 1169-1677, apr.2002.

PEGORARO, L.M.C. **Efeito das condições de cultivo sobre a proporção macho: fêmea e a congelabilidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro***. 1997. 117f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1997.

PETERSON, A. J.; LEE, R. S. Improving Successful Pregnancies after Embryo Transfer. **Theriogenology**, v. 59, n.2, p. 687-697, jan.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 Research**, v.30, n.9, p. 26-36, may 2002.

PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B.D. *In Vitro*- Matured/ *In Vitro*- Fertilized Bovine Oocytes Can Develop Into Morulae/ Blastocysts in Chemically Defined, Protein- Free Culture Media. **Biol Reprod**, v.45, n.5, p.736-742, nov.1991.

PONTES, J. H. F. **Aspectos aplicados da produção *in vitro* de embriões bos indicus**. 2009. 160 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

PRESTES, N.C.; LANDIM- ALVARENGA. F.C.; **Obstetrícia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 241p.

RATHMELL, J. C.; THOMPSON, C. B. Pathways of Apoptosis in Lymphocyte Development, Homeostasis, and Disease. **Cell**, v.109, n. S97-107, apr.2002.

RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N.M.; BETTERIDGE, K.J. Developmentally Related Changes in the Metabolism of Glucose and Glutamine By Cattle Embryos Produced and Co- Cultured *In Vitro*. **J Reprod Fertil**. v.95, n.2, p.585–595, jul.1992.

RODMAN, T.C. et al. Turnover of Basic Chromosomal Proteins in Fertilized Eggs: A Cytoimmunochemical Study of Events *In Vivo*. **J Cell Biol**; v.90, n.2, p. 351-361, aug.1981.

ROGERS, N. T. et al. The Absence of a Ca²⁺ Signal During Mouse Egg Activation Can Affect Parthenogenetic Preimplantation Development, Gene Expression. Patterns, and Blastocyst Quality. **Reproduction**. v. 132, n.1, p. 45-57, jul.2006.

ROUX, P.P.; BLENIS, I. J. ERK and P38 MAPK- Activated Protein Kinases: A Family of Protein Kinases with Diverse Biological- Functions. **Microbiol. Mol. Biol.**, v. 68, p.320-344, 2004.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **R. Bras. Zootec**. Viçosa, v.36, July 2007.

RUPIK, W. et al. The Expression Patterns of Heat Shock Genes and Proteins and their Role During Vertebrate's Development. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v.159, n.4, p.349-366, aug.2011.

SAKKAS, D. et al. Sperm Chromatin Anomalies Can Influence Decondensation after Intracytoplasmic Sperm Injection. **Hum. Reprod**. v.11, n.4, p. 837-843, apr/1996.

SANTANA, P. de P. B., **A influência do sistema nitrgico no cultivo *in vitro* de embriões bovinos**. 2012. Dissertação (mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará, Pará, 2012.

SANTORO, M.G. Heat Shock Factors and the Control of Stress Response. **Biochemical Pharmacology**. v.59, n.1, p. 63-66, jan.2000.

SARGE K. D.; MURPHY S. P.; MORIMOTO R. I. Activation of Heat Shock Gene Transcription By Heat Shock Factor 1 Involves Oligomerization, Acquisition of DNA-Binding Activity, and Nuclear Localization and Can Occur in the Absence of Stress, **Mol. cell. biol.** v.13, n.3, p.1392-1407, mar.1993.

SCHWARTZMAN, R.A.; CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis: The Biochemistry and Molecular Biology of Programmed Cell Death. **Endocr. Vet**, v. 14, n.2, p. 133-151, apr.1993.

SENEDA, M. M. et al. Relationship Between Follicle Size and Ultrasound- Guided Transvaginal Recovery. **Animal Reproduction Science**, Londrina, v. 67, n.1-2, p. 37-43, jul.2001.

SHEN,P.C. et al. The Effect of Activation Treatments on the Development of Reconstructed Bovine Oocytes. **Animal Reproduction Science**. v.106, n.1-2, p.1-12, mar. 2007.

SIQUEIRA, L. G. et al. Pregnancy Rates and Corpus Luteum- Related Factors Affecting Pregnancy Establishment in Bovine Recipientes Synchronized for Fixed-Time Embryo Transfer. **Theriogenology**, v. 72, n. 7, p. 949-58, 2009.

SIRARD, M.A. et al. Contribution of the Oocyte to Embryo Quality. **Theriogenology, Rev. Reprod**. v. 65, n.1, p. 126-136, jan.2006.

SIRARD, M. A.; PICARD, L.; DERY, M. The Time Interval Between FSH Administration and Ovarian Aspiration Influences the Development of Cattle Oocytes. **Theriogenology**, v. 51, n.4, p. 699-708, mar.1999.

SIRARD, M.A. The Culture of Bovine Oocytes to Obtain Developmentally Competent Embryos. **Biol Reprod**. v. 39, n.3, p.546-552, oct.1988.

SISTONEN, L.; SARGE, K.D.; MORIMOTO, R.I. Human Heat Shock Factors 1 And 2 are Differentially Activated and Can Synergistically Induce Hsp70 Gene Transcription. **Mol. Cell. Biol.** v.14, n.3, p. 2087-2099, mar.1994.

SONG, J.L.; WESSEL, G.M. How to Make an Egg: Transcriptional Regulation in Oocytes. **Differentiation**, England, v.73, n.1, p.1-17, feb.2005.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. Birth after the Reimplantation of a Human Embryo. **Lancet**, v. 2, n.8085, p.366, aug.1978.

STOJKOVIC, M. Et Al. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After *In Vitro* Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity after *In Vitro* Fertilization and Culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, n.3, p. 904–909, mar.2001.

SUH WC, LU CZ, GROSS CA. Structural Features Required for the Interaction of the Hsp70 Molecular Chaperone DnaK with its Co-chaperone DNAJ. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n.43, p. 30534-30539, 1999.

SZOLLOSI, D. Oocyte Maturation. in: THIBAUT, C. I. LEVASSEUR, M.C.; HUNTER, R. H. F. **Reproduction in mammals and man**. Paris, p. 307-325, 1993.

TAKAHASHI, M. et al. A. Assessment of DNA Damage in Individual Hamster Embryos By Comet Assay. **Molecular reproduction and development**, v.54, n.1, p. 1-7, sept.1999.

TAKAHASHI Y, FIRST LN. *In Vitro* Development of Bovine One- Cell Embryos: Influence of Glucose, Lactate, Pyruvate, Amino Acids and Vitamins. **Theriogenology**, v.37, n.5, p.963-978, may 1992.

TANEJA, M.; BOLS, P. E. J.; VELDE, V. Development Competence of Juvenile Calf Oocytes *In Vitro* and *In Vivo*: Influence of Donor Animal, Variation and Repeated Gonadotropin Stimulation. **Bio. Reprod.**, v. 62, n.1, p. 206-213, jan.2000.

TERVIT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G.; ROWSON, L.E. Successful Culture *In Vitro* Sheep and Cattle Ova. **J Reprod Fertil**, v.30, n.3, p.493-497, sept.1972.

TILLY, J. L. et al. Involvement of Apoptosis in Ovarian Follicular Atresia and Postovulatory Regression. **Endocrinology**, v. 129, n.5, p. 2799-801, nov.1991.

THOMPSON, J.G. Defining the Requirements for Bovine Embryo Culture. **Theriogenology**, v.45, n.1, p.27-40, jan.1996.

TSAFRIRI, A.; MOTOLA, S. Are Steroids Dispensable for Meiotic Resumption in Mammals? **Trends in endocrinology and metabolism**, v.18, n.8, p.321-327, oct.2007.

TSAN, M.F.; GAO, B. Endogenous Ligands of Toll- Like Receptors. **J Leukoc Biol**. v.76, n.3, p.514-519, sept.2004.

URNER, F.; SAKKAS, D. Characterization of Glycolysis and Pentose Phosphate Pathway Activity During Sperm Entry Into the Mouse Oocyte. **Biol Reprod**. v.60, n.4, p.973-978, apr.1999.

URNER F, SAKKAS D. Glucose Participates in Sperm- Oocyte Fusion in the Mouse. **Biol Reprod**, v. 55, n.4, p.917-922, oct.1996.

URANGA, J.A.; ARECHAGA, J. Cell Proliferation is Reduced in Parthenogenetic Mouse Embryos at the Blastocyst Stage; A Quantitative Study . **The Anatomy Record**, v.247, n.2, p.243-247, feb.1997.

VAN DE VELDE, A. et al. Cell Allocation and Chromosomal Complement of Parthenogenetic and IVF Bovine Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.54, n.1, p.57-62, sept.1999.

- VAN SOOM, A. Prevalence of Apoptosis and Inner Cell Allocation in Bovine Embryos Cultured Under Different Oxygen Tensions with or Without Cysteine Addition. **Theriogenology**, New York, v.57, n.5, p. 1453-65, 2002.
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. Ovum Pick Up and *In Vitro* Production in the Bovine after Use in Several Generations: A 2005 Status. **Theriogenology**, v.65, n.5, p. 914-925, mar.2006.
- VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F. M. de A. L. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev Bras Reprod Anim**. Belo Horizonte, v.32, n.2, p.100-109, abr./jun. 2008.
- VIANA, J. H. M., et al. Use of *In Vitro* Fertilization Technique in The Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientiarum Veterinariae**, Juiz de Fora, v. 38, n.2, p. 661-674, aug.2010.
- VIANA, J. H. M. et al. Associação entre as técnicas de punção folicular e colheita de embriões em vacas Gir. **Arquivos da faculdade de veterinária UFGRS**, v.32, n. 1, p. 193, 2004.
- VITULO, A. D.; OZIL, J. P. Repetitive Calcium Stimuli Drive Meiotic Resumption and Pronuclear Development During Mouse Oocyte Activation. **Development Biology**. San Diego, v. 151, n.1, p. 128-136, may 1992.
- XU, K.P.; BRACKET, B.G. A Detailed Analysis of Early Events During *In Vitro* Fertilization of Bovine Follicular Oocytes. **J Reprod Fertil**, v.82, n.1, p.127-134, jan.1988.
- WALES, R.G.; WHITTINGHAM, D.G. A Comparison of The Uptake and Utilization of Lactate and Pyruvate in One- and Two- Cell Mouse Embryos. **Biochim Biophys Acta**, v. 148, n.3, p.703-712, dec.1967.
- WANG, Z.G. et al. Effects of Different Activation Protocols on Preimplantation Development Apoptosis and Ploidy of Bovine Parthenogenetic Embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.105, n.3-4, p.292-301, may 2008.
- WANG W. H. et al. Activation of Porcine Oocytes with Calcium Ionophore: Effects of Extracellular Calcium. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 99-107, 1999.
- WANG, B. et al. The *In Vitro* and *In Vivo* Development of Goat Embryos Produced By Intracytoplasmic Sperm Injection Using Tail- Cut Spermatozoa. **Zygote**, v.11, n.3, p.219-227, aug.2003.
- WARD, F. et al. Optimization of *In Vitro* Bovine Embryo Production: Effect of Duration of Maturation, Length of Gamete Co- Incubation, Sperm Concentration and Sire. **Theriogenology**, v.57, n.8, p. 2105-2117, may 2002.

WARD, F. et al. Paternal Influence on the Time of First Embryonic Cleavage Post Insemination and the Implications for Subsequent Bovine Embryo Development *In Vitro* and Fertility *In Vivo*. **Mol Reprod Dev.**, v.60, n.1, p.47-55, Sept.2001.

WASSAMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. Cytochalasin B-Induced Pseudocleavage of Mouse Oocytes *In Vitro*: Asymmetric Localization of Mitochondria and Microvilli Associated with a Stage- Specific Response. **J. Cell Sci**, v.21, n.3, p. 523-535, aug.1994.

WELCH, W.J. Mammalian Stress Response: Cell Physiology, Structure/Function of Stress Proteins, and Implications for Medicine and Disease. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 4, p. 1063-1081, oct.1992.

WILLIAMS, C. J. Signalling Mechanisms of Mammalian Oocyte Activation. **Human reproduction update**, v.8, n.4, p.313-321, jul/aug.2002.

WHITTEN, W.K.; BIGGERS, J.D. Complete Development *In Vitro* of Pre-Implantation Stages of the Mouse in a Simple Chemically Defined Medium. **J Reprod Fertil**, v.17, n.2, p.399-401, nov.1968.

WHITTINGHAM, D.G.; BIGGERS, J.D. Fallopian Tube and Early Cleavage in the Mouse. **Nature**, v.213, n.5079, p.942, mar.1967.

WRENZYCKI, C. et al. Messenger RNA Expression Patterns in Bovine Embryos Derived from *In Vitro* Procedures and their Implications for Development. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.17, n.1-2, p.23-35, 2005.

Wu, C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v, 11, p, 441-469, 1995

WU, J.; ZHANG, L.; WANG, X. *In Vitro* Maturation, Fertilization and Embryo Development after Ultrarapid Freezing of Immature Human Oocytes. **Reproduction**, v.121, n.3, p. 389-393, mar.2001.

YANAGIMACHI, R. Mechanisms of Fertilization in Mammals. **Fertilization and embryonic development in vitro**. New York: Plenum Press, 1981. Cap.3, p.82-186.

YUAN, Y.Q. et al. Influence of Oxygen Tension on Apoptosis and Hatching in Bovine Embryos Cultured *In Vitro*. **Theriogenology**, v. 59, n.7, p. 1585-1596, apr.2003.

ANEXOS

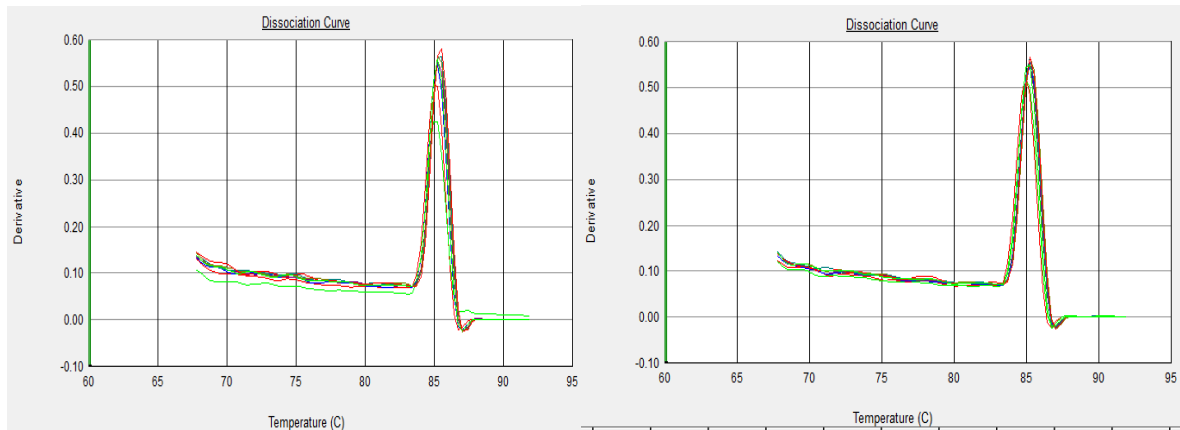


Figura 4. Curvas de dissociação do gene B ACTINA obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part, respectivamente.

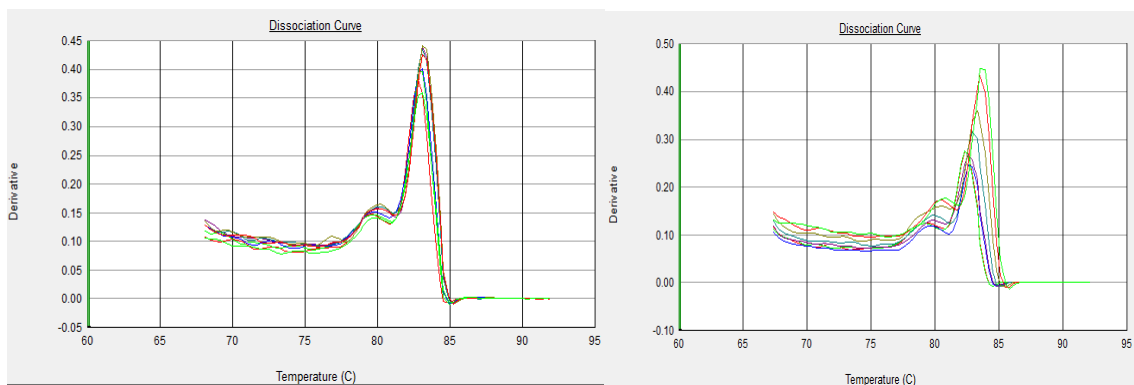


Figura 5. Curvas de dissociação do gene *DNAJB1* obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part, respectivamente.

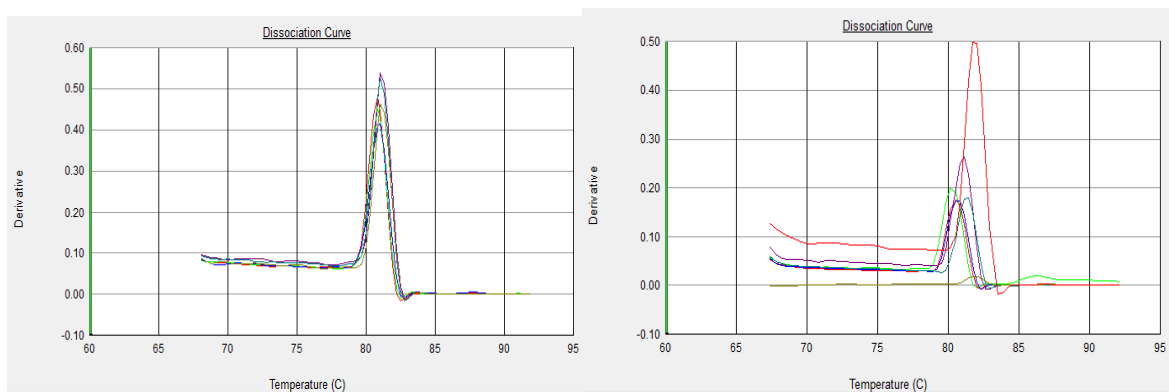


Figura 6. Curvas de dissociação do gene *HSPA1L* obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part, respectivamente.

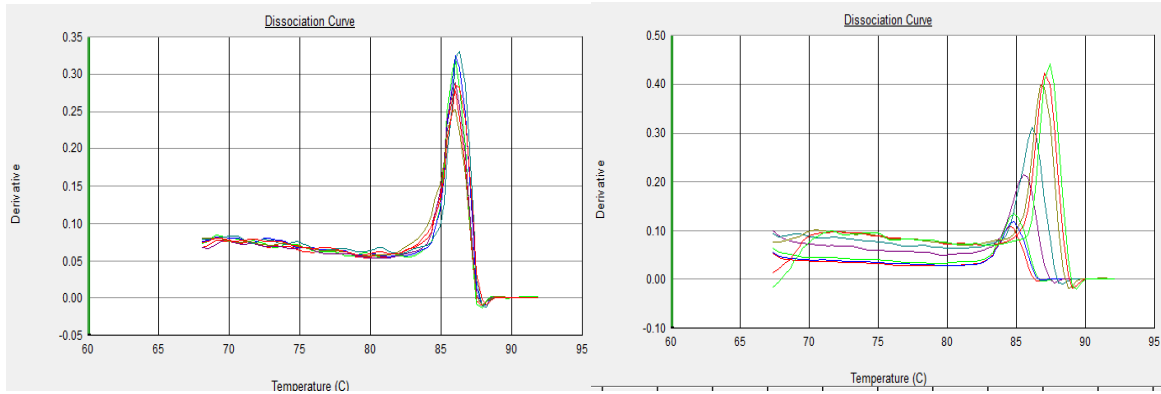


Figura 7. Curvas de dissociação do gene *HSP1* obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part, respectivamente.

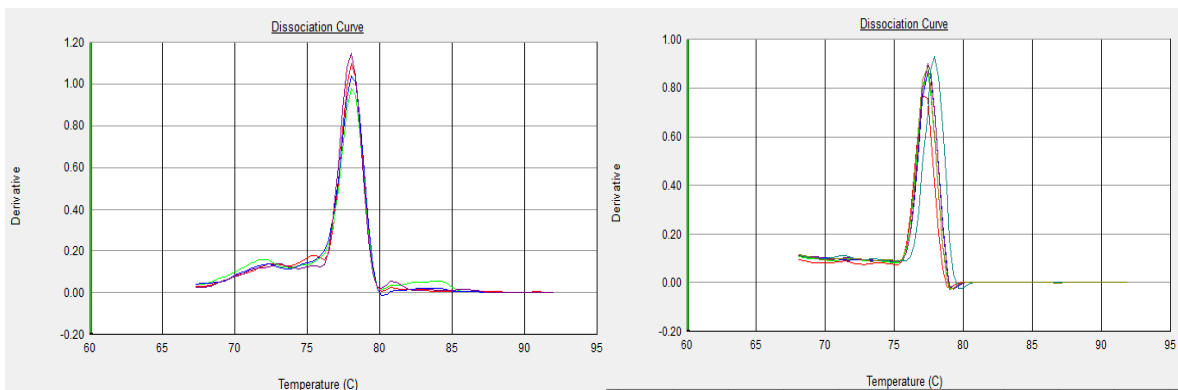


Figura 8. Curvas de dissociação do gene *HSF2* obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part, respectivamente.

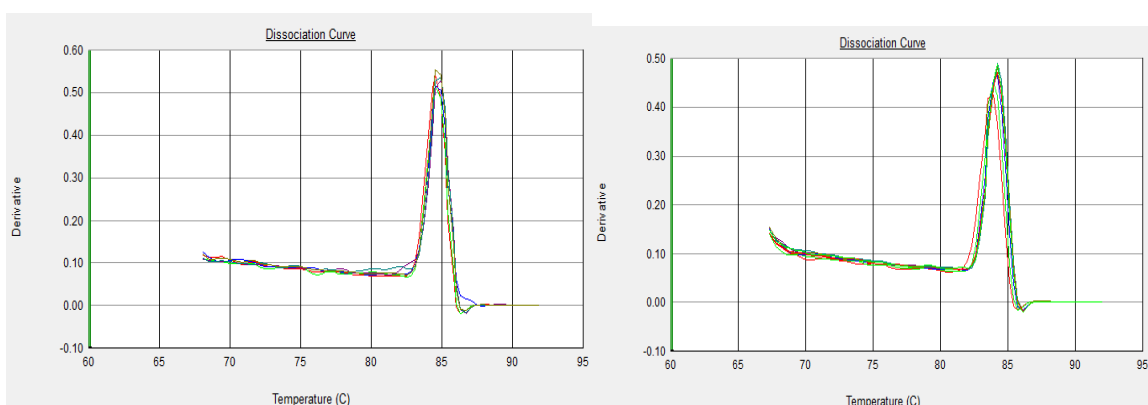


Figura 9. Curvas de dissociação do gene *HSP27P1* obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part, respectivamente.

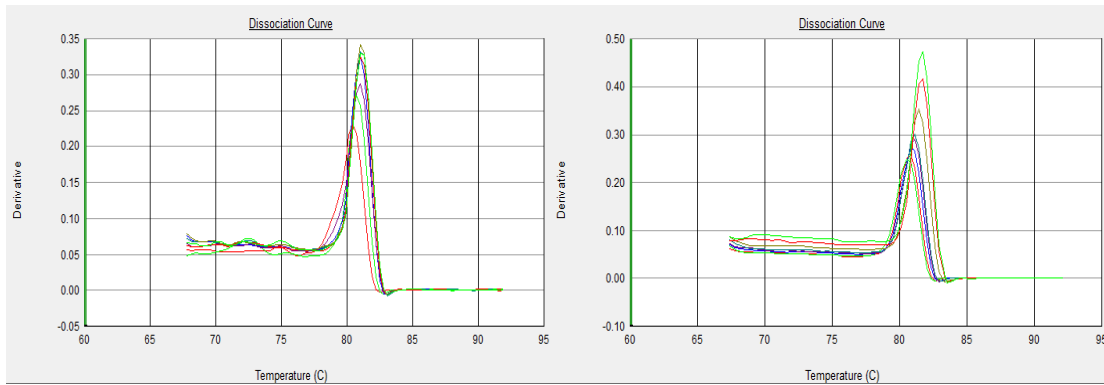


Figura 10. Curvas de dissociação do gene *GLUT1* obtida após ampliação por PCR em tempo real dos zigotos com 8 células FIV e Part, respectivamente.