

DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS PELA TRANSFERÊNCIA NUCLEAR COM CITOPLASMA DE OÓCITOS MATURADOS *IN VITRO* OU *IN VIVO*

Raquel Varella Serapião¹; Carolina Capobianco Romano Quintão²; Michele Munk Pereira³; Lilian Tamy Iguma⁴; Bruno Campos Carvalho⁵; Juliana Polisseni³; José Nélcio Sales⁶; Paulo Henrique Campos Jr⁷; André Penido Oliveira³; João Henrique Moreira Viana⁴; Luiz Sérgio Almeida Camargo⁴

¹Pós-doutoranda da Embrapa Gado de Leite; ²Analista da Embrapa Gado de Leite; ³Estudante de Pós-Graduação da UFJF; ⁴Pesquisador da Embrapa Gado de Leite; ⁵Pesquisador da EPAMIG; ⁶Estudante de Pós-Graduação da USP; ⁷Estudante de Ciências Biológicas do CES/JF;

E-mail: camargo@cnp.gl.embrapa.br

Palavras-chave: transferência nuclear, expressão gênica

INTRODUÇÃO

A transferência nuclear com células somáticas (TNCS) é uma tecnologia valiosa para a multiplicação de animais, melhoramento genético e preservação de espécies em risco de extinção (CUNNINGHAM, 1998; VAN VLECK, 1999; LEWIS *et al.*, 2000). Contudo, o foco principal da TNCS tem sido a produção de animais transgênicos (POLEJAEVA & CAMPBELL, 2000; HEYMAN, 2005), principalmente nos ruminantes, superando limitações da microinjeção pronuclear (KEEFER, 2004). Apesar da grande expectativa com a transferência nuclear com células somáticas em animais domésticos, a sua eficiência ainda é limitada (THIBAUT, 2003; POWELL *et al.*, 2004). A ineficiência e alterações fetais podem ser devidas a distúrbios na reprogramação epigenética no núcleo da célula doadora após ser transferido ao citoplasma receptor (SHI *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2003).

Um componente importante para a reprogramação do núcleo somático é o citoplasma do oócito receptor, desde que o contato da cromatina do núcleo doador com fatores citoplasmáticos do oócito é considerado essencial para modificações epigenéticas no núcleo e para o desenvolvimento posterior do embrião (BEAUJEAN *et al.*, 2005). A fonte de citoplasmas receptores para TNCS em bovinos tem sido oócitos obtidos de animais abatidos em matadouro, sem origem conhecida, e maturados *in vitro*. O processo de maturação *in vitro* e a origem desconhecida podem comprometer a qualidade dos oócitos. YANG e colaboradores (2008) relataram diferente potencial em produzir embriões clones quando se utilizava oócitos de doadoras diferentes, sugerindo que algum componente genético no citoplasma e inerente à doadora possa contribuir para a reprogramação nuclear.

Tratamentos hormonais têm sido aplicados visando melhorar a qualidade dos oócitos para a produção *in vitro* de embriões (RAMOS *et al.*, 2007; DE ROOVER *et al.*, 2008). O hormônio FSH tem ação de estimular o crescimento de folículos e com isso melhorar a competência dos oócitos (SIRARD *et al.*, 2007). Uma maior competência do oócito poderia ser alcançada por meio de uma pré-maturação, que *in vivo* ocorre em folículos dominantes e termina logo após o surgimento da onda pré-ovulatória de LH (DIELEMAN *et al.*, 2002). Assim, estímulos de FSH seguido de estímulo com LH exógeno poderiam promover uma pré-maturação e contribuir para aumentar o potencial de desenvolvimento *in vitro* do oócito imaturo. Por outro lado, tem-se reportado que a maturação *in vivo* dos oócitos, obtida após 18-22h da aplicação de GnRH exógeno, aumenta a competência dos oócitos em gerar blastocistos após a fecundação *in vitro* (HENDRIKSEN *et al.*, 2000; HUMBLLOT *et al.*, 2005). O citoplasma dos oócitos bovinos maturados *in vivo* poderia ser também mais eficiente na reprogramação do núcleo doador e melhorar o processo de TNCS.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de se obter oócitos maturados *in vitro* obtidos de doadoras vivas e de oócitos obtidos de doadoras vivas estimuladas hormonalmente com FSH e um análogo do GnRH, visando a produção de embriões clones.

MATERIAL E MÉTODOS

- Obtenção dos oócitos

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal e nos Campos Experimentais da Embrapa Gado de Leite. Foram estabelecidos três grupos experimentais. Grupo 1 (G1): oócitos obtidos via punção folicular orientada por ultrassonografia (OPU) de doadoras não superestimuladas, com citoplasma homogêneo e células do cúmulus compacta maturados *in vitro* por 17-19h. Grupo 2 (G2): oócitos obtidos via OPU de doadoras superestimuladas com FSH (Folltropin) e análogo de GnRH (Gonadorelina Gestran-Plus),

apresentando citoplasma homogêneo com expansão total das células do cumulus, considerados maturados. Grupo partenogenético (PART): oócitos obtidos de ovários coletados em matadouro com citoplasma homogêneo e células do cumulus compacta maturados *in vitro* por 24h. Este grupo constituiu o controle da ativação para G1 e G2.

- Enucleação, transferência nuclear e ativação dos embriões reconstruídos e partenotos

Oócitos dos grupos G1 e G2 foram desnudados com hialuronidase 1 % em PBS e expostos a citocalasina B e Hoechst 33342 por 15 minutos para visualização e remoção da placa metafásica. A enucleação foi realizada em meio TALP HEPES + 1% BSA e a remoção da placa metafásica confirmada pela exposição do carioplasto à luz ultravioleta. Oócitos enucleados foram reconstruídos com fibroblastos (vaca da raça Gir) entre a quarta e sétima passagem, cultivados em incubadora com 5% CO₂ e 38,5°C até atingirem a confluência por três a cinco dias. A célula doadora foi inserida no espaço perivitelino e o conjunto carioplasto-citoplasto submetido à eletrofusão em solução de manitol com MgCl₂, utilizando-se 2,4 kV/cm, em dois pulsos de 30 microsegundos. Os conjuntos carioplasto-citoplasto foram cultivados em CR2aa em 5% CO₂ a 38,5°C em ar por 1-3 horas. A ativação dos grupos G1, G2 e PART foi realizada com ionomicina por 4 minutos seguido de 4 horas em 6-DMPA (Sigma), ambos em meio CR2aa sob as mesmas condições atmosféricas.

- Cultivo embrionário

Zigotos reconstruídos por transferência nuclear e os partenotos foram cultivados em poços de 500 µl de meio CR2aa + 2,5% SFB em 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂ a 38,5°C. A taxa de clivagem foi avaliada com 72h após fecundação/ativação e a de blastocistos no 7º dia.

- Análise estatística

O número de folículos, de oócitos e de oócitos viáveis foi submetido à análise de variância. As taxas de recuperação, oócitos viáveis, fusão, clivagem e blastocisto foram avaliadas por Qui-quadrado ou teste exato de Fischer.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra a quantidade e viabilidade de oócitos obtidos por punção folicular após o estímulo hormonal com FSH e GnRH (G2) comparada com oócitos obtidos por punção folicular de doadoras sem estímulo hormonal (G1). Não se observou diferença ($P>0,05$) quanto ao número de folículos visualizáveis e número de oócitos totais obtidos por OPU, porém a taxa de recuperação e de oócitos viáveis foram menores ($P<0,05$) para as sessões de punção realizadas após a super-estimulação com FSH seguido de GnRH. Apesar do número de oócitos viáveis não ter sido diferentes ($P>0,05$) entre os grupos G1 e G2, os valores foram numericamente menores para o G2, o que deve ter contribuído para a redução da taxa de oócitos viáveis.

Tabela 1. Efeito do tratamento superestimulatório com FSH e GnRH na produção de oócitos bovinos. Valores são mostrados como média±EPM com exceção das taxas de recuperação de oócitos e de oócitos viáveis.

Tratamento	Nº OPU	Nº folículos/OPU ¹	Nº oócitos/OPU ¹	Taxa de recuperação ²	Nº oócitos viáveis/OPU ¹	Taxa oócitos viáveis ²
Sem estímulo (G1)	8	18,5±5,02 ^a	16,25±3,2 ^a	87,24 ^a	12,7±2,8 ^a	78,46 ^a
FSH + GnRH (G2)	8	21,5±4,63 ^a	13,75±3,9 ^a	63,21 ^b	7,75±3,6 ^a	56,36 ^b

OPU: punção folicular com auxílio de ultrasson.

Valores entre linhas com diferentes letras subscritas diferem entre si ($P>0,05$). 1: Análise de variância; 2: Qui-quadrado.

O experimento mostrou que a super-estimulação do FSH seguido punção folicular 18h após aplicação de GnRH, com o intuito de induzir a maturação dos oócitos, não influenciou o número de folículos ou de oócitos recuperados, contudo reduziu a taxa de recuperação de oócitos e a taxa de oócitos viáveis. Esses últimos resultados podem ter sido devido a maior dificuldade em recuperar os oócitos após a super-estimulação com FSH e GnRH. Os oócitos desse grupo apresentavam-se com extensa expansão das células do cumulus tornando sua recuperação por meio da punção folicular mais difícil, assim como a buscas dos mesmos nas placas. Essas dificuldades fizeram com que somente poucos oócitos pudessem ser utilizados para a geração de embriões clones, como observado na tabela 3.

A origem do oócito não afetou a taxa de fusão dos oócitos receptores com as células somáticas utilizadas como doadoras de núcleo. Citoplasmas enucleados de oócitos do G1 tiveram taxa de fusão semelhante ($P>0,05$) aos oócitos obtidos em G2 (tabela 2).

Tabela 2. Efeito da origem do oócito bovino sobre a taxa de fusão.

Origem	N	Taxa de fusão oócito-célula somática N (%)
Oócitos de OPU maturados <i>in vitro</i> (G2)	52	36 (69,2%) ^a
Oócitos de OPU de doadoras superestimuladas (G3)	28	16 (57,1%) ^a

Não há diferença entre grupos ($P>0,05$). Qui-quadrado

A tabela 3 mostra que não há diferença ($P>0,05$) na taxa de clivagem e produção de blastocistos clones quando o citoplasma receptor é oriundo de oócitos submetidos à maturação *in vitro* obtidos por punção folicular (G1) ou quando é obtido por punção folicular 18h após superestímulo hormonal com FSH e GnRH (G2). Valores semelhantes foram obtidos com os embriões partenogenéticos. Contudo deve-se levar em conta o baixo número de embriões clones do grupo G2 disponíveis para cultivo após fusão.

Tabela 3. Efeito da origem do oócito na produção de embriões clones bovinos.

Origem	N	Clivagem N (%)	Blastocistos D7 N (%)	Blastocistos D7/ Clivados (%)
Oócitos de OPU maturados <i>in vitro</i> (G1)	36	28 (77,7%) ^a	9 (25,0%) ^a	32,1% ^a
Oócitos de OPU de doadoras superestimuladas (G2)	15	11 (73,3%) ^a	3 (20,0%) ^a	27,3% ^a
Partenogênese (PART)	192	150 (78,1%) ^a	55 (28,6%) ^a	36,7% ^a

Não há diferença entre grupos ($P>0,05$). Teste exato de Fisher.

Zigotos dos grupos G1, G2 e PART clivaram e desenvolveram a blastocistos em taxas semelhantes ($P>0,05$), mostrando não haver influência da origem do oócito receptor sobre esses parâmetros. Considerando-se as dificuldades encontradas para obter oócitos 18h após superestímulo hormonal com FSH e GnRH (G2) e que a taxa de produção de embriões foi semelhante aos oócitos após a maturação *in vitro*, obtidos por punção folicular, não se observa uma vantagem deste sistema na geração de embriões clones. A obtenção de oócitos receptores por punção folicular seguido da maturação *in vitro* é viável para geração de embriões clones, enquanto a super-estimulação com FSH e GnRH 18 h antes da punção folicular, não contribui para o aumento da taxa de oócitos viáveis disponíveis para clonagem.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos, a Embrapa Gado de Leite, CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEAUJEAN, N.; MARTIN, C.; DEBEY, P.; RENARD, J.P. Reprogramming and epigenesis. **Medical Science**, v. 21, p. 412-421, 2005.
- CUNNINGHAM, E.P. The potential of new reproductive and genetic technologies. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science**, supl. 29, p. 67-76, 1998.
- DE ROOVER, R.; FEUGANG, J.M.; BOLS, P.E.; GENICOT, G.; HANZEN, CH. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 239-245, 2008.
- DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T.A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B.M.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v.57, p. 5-20, 2002.
- HAN, Y.M.; KANG, Y.K.; KOO, D.B.; LEE, K.K. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, v.59, p. 33-44, 2003.

- HENDRIKSEN, P.J.; VOS, P.L.; STEENWEG, W.N.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.11-20, 2000.
- HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p.353-361, 2005.
- HUMBLLOT, P.; HOLM, P.; LONERGAN, P.; WRENZYCKI, C.; LEQUARRE, AS.; JOLY, C.G.; HERRMANN, D.; LOPES, A.; RIZOS, D.; NIEMANN, H.; CALLESEN, H. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 63, p.1149-1166, 2005.
- KEEFER, C.L. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. **Animal Reproduction Science**, p. 82-83:5-12, 2004.
- LEWIS, I.M.; MCCLINTOCK, A.E.; FENCH, A.I.; ZUELKE, K.A.; HARFORD, B.A.; TROUSON, A.O. Cloning and transgenesis in farm animals – an Australian perspective. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 694-697, 2000.
- POLEJAEVA, I.A.; CAMPBELL, K.H. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. **Theriogenology**, v. 53, p.117-126, 2000.
- POWELL, A. M.; TALBOT, N. C.; WELLS, K. D.; KERR, D. E.; PURSEL, V. G.; WALL, R. J. Cell Donor Influences Success of Producing Cattle by Somatic Cell Nuclear Transfer. **Biology of Reproduction**, v.71, p. 210-216, 2004.
- RAMOS, A.A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W.F.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; POLISSENI, J.; HENRY, M. Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção *in vitro* de embriões em vacas Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 380-386, 2007
- SHI, W.; ZAKHARTCHENKO, V.; WOLF, E. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. **Differentiation**, v. 71, p.91-113, 2003.
- SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. In vivo and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v. 68, p. S71-S76, 2007.
- THIBAUT, C. Recent data on the development of cloned embryos derived from reconstructed eggs with adult cells. **Reproduction Nutrition Development**, v. 43, p. 303-324, 2003.
- VAN VLECK, L.D. Implications of cloning for breed improvement strategies: are traditional methods of animal improvement obsolete. **Journal Animal Science**, v. 82, p. 111-121, 1999.
- YANG, X.Y.; ZHAO, J.G.; LI, H.; LIU, H.F.; HUANG, Y.; HUANG, S.Z.; ZENG, F.; ZENG, Y.T. Effect of individual heifer oocyte donors on cloned embryo development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 28-37, 2008.

CERTIFICADO



Conferido a

Serapião R.V., Quintão C.C.R., Pereira M.M., Iguma L.T., Carvalho B.C., Polisseni J., Sales J.N., Junior P.H.C., Oliveira A.P., Viana J.H.M., Camargo L.S.A. por apresentarem trabalho " DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS PELA TRANSFERÊNCIA NUCLEAR COM CITOPLASMA DE OÓCITOS MATURADOS *IN VITRO* OU *IN VIVO*" na

XXXII Semana de Biologia da UFJF e
XV Mostra de Produção Científica realizada no
período de 19 a 23 de outubro com 3 hs de duração.

Juiz de Fora, 23 de outubro de 2009

Amaury Caiafa Duarte
Diretor do Instituto de Ciências Biológicas

Neijma Alice Menezes Evangelista
Coordenadora da SemBio 09

Realização:



APOIO:



Tel.: 3249-0074

