UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

Paula Ripamonte Figueiredo

**Genômica funcional da ativação do genoma e
do bloqueio embrionário em bovinos**

Pirassununga
2005

PAULA RIPAMONTE FIGUEIREDO

Genômica funcional da ativação do genoma e do bloqueio embrionário em bovinos

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

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

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

F475g	<p>Figueiredo, Paula Ripamonte</p> <p>Genômica funcional da ativação do genoma e do bloqueio do desenvolvimento embrionário em bovinos / Paula Ripamonte Figueiredo – Pirassununga, 2005.</p> <p>101 f.</p> <p>Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.</p> <p>Departamento de Ciências Básicas.</p> <p>Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.</p> <p>Unitermos: 1. Embriões bovinos 2. Differential display PCR 3. Genoma – ativação 4. Bloqueio embrionário 5. PI3K I. Título.</p>
-------	--

"Todo homem, por natureza, quer saber."

Aristóteles

"O começo é a parte mais importante do trabalho."

Platão

"Um bom começo é a metade."

Aristóteles

Dedicatória

Ao meu **Marido**

Luís Gustavo, amado companheiro,
sempre presente em todos os
momentos. Pelo amor incondicional e
pelo apoio fundamental.

Oferecimento

Aos meus queridos

Pais, Francisco e Fernanda

Irmãs, Camila e Estela

Avós, Benedito, Lavínia, Antônio e Diva

Sogros, Antônio e Vera

Cunhados, Washington, César e Érica

Sobrinhas, Larissa e Ana Luiza

Amigos, Gerson e Luciana

Afilhado, Gabriel

"Cãopanheiros", Buddy e Tina

Este trabalho só se tornou possível porque tenho ao meu lado,
amparando-me, fortalecendo-me, pessoas maravilhosas.

Se, nestes anos de trabalho e ausências, eu me esqueci de dizer, digo agora:

Amo-os de todo meu coração!

Agradecimentos

Deus, eu vos agradeço, Senhor, por me conceder a vida e a oportunidade de estudá-la, tentando entendê-la.

Ao Professor **Dr. Flávio Vieira Meirelles**, por mais esta orientação repleta de ensinamentos, amizade e, principalmente, confiança. Nestes anos ao seu lado, fui aprendendo, não apenas as técnicas, instrumentos da pesquisa, mas a “fazer ciência”, com a aptidão de que é detentor. Este trabalho é, para mim, mais um fruto deste aprendizado. Muito Obrigada!

Ao **Dr. Alexandre Rodrigues Caetano**, pela co-orientação, de fato, tão necessária para meu desenvolvimento técnico e científico. Pela paciência em me mostrar os caminhos certos, ser objetiva e organizada. Pela amizade e pelos muitos conselhos. Muito Obrigada!

A **FAPESP**, por mais este indispensável apoio financeiro que possibilitou o meu aprimoramento acadêmico e também o desenvolvimento deste trabalho. Reconhecimento e gratidão.

A todos integrantes e ex-integrantes do LMMD e adjacências (em ordem alfabética), **Adriana K. Tarouco, Alexandre Barreto, Alexandre R. Caetano, Aline S. M. César, Andrea B. V. José, Cláudia L. V. Leal, Edson LoTurco, Fabiana Bressan, Felipe C. Braga, Fernando H. Biase, Flávio P. Júnior, Flávio V. Meirelles, Giovana K. F. Merighe, Gisele Z. Mignotti, Helena J. Alves, Isabele P. Emanuelli, José Bento F. F. Neto, Kátia L. Schwartz, Lígia G. Mesquita, Mariana Baccaglini, Mariene Miyoko Natori, Marcos Roberto Chiaratti, Minos E. de Carvalho, Moysés S. Miranda, Nilton P. dos Santos, Paulo Adona, Patrícia M. Porciúncula, Pedro Ratto, Raquel Z. Puelker, Renata Camila Cabral, Sheila M. Garcia, Silvia F. Carambula, Sylvia S. Cortezzi, Tiago H. C. de Bem, Weruska K. Santos e Yeda F. Watanabe**. Todos vocês, de alguma maneira, contribuíram para minha formação científica e pessoal. Sou-lhes eternamente agradecida.

Em especial, a **Lígia** e a **Sylvia**, pela ajuda na produção das amostras, padronização e finalização dos últimos experimentos.

Aos Professores, **Dr. Mário Binelli** e **Dr. José Buratini Jr.**, pelas valiosas críticas, correções, sugestões e louvores na avaliação deste trabalho durante a qualificação.

Ao Professor **Dr. Luiz Lehmann Coutinho** e **Lílian Giotto Zaros**; **Dr. Alexandre R. Caetano**, **Julie Nardelli**, **Érica D. Silveira**, pelo auxílio nos sequenciamentos realizados.

Ao Amigo e Professor, **Dr. Júlio C. Balieiro**, pela disposição e disponibilidade nas análises estatísticas. Pela ajuda "extra-tese", estendo meu agradecimento à **Priscila**.

A Amiga **Sílvia Binotti**, pelos ensinamentos de Inglês, Português e, principalmente, de Vida. A solução certa no momento exato, conselhos, conversas... O mais falado idioma foi o da amizade.

Ao **Luiz Roberto Rosati** e toda sua família, **Cláudia**, **Carla**, **Fernanda**, **Mariana**, **D. Terezinha** e **Sr. José Carlos Rosati** (*in memoriam*), pelo apoio, carinho e amizade desde minha chegada a Pirassununga.

Aos Amigos de todas as horas, **Amaury** e **Lí**; **Pati** e **Isa**; **Marquinho** e **Xeila**; "**Birita-Bibi**", **Sylvia** e **Moysés**; **Elis** e **Mário**; **Gerson**, **Lu**, **Gabriel**, **Dona Toninha** e **Seu Jair**; **Mariney**, **Alexandre**, **Carol** e **Bruno**; **Aline**, **Albino** e **André**; **Saulo** e **Luciane**. A companhia, as palavras de amizade e todo carinho foram fundamentais em minha estada em Pirassununga.

Ao **Sr. Waldomiro** e **Fernando**, amigos do Café do Ponto, pela presteza nos momentos de pressa, em que almoços se transformaram em rápidos lanches. Pela descontração nas manhãs de sábado. Pela confiança e boa conversa.

A **FZEA**, **Professores** e **Funcionários**, pelo inestimável apoio nas atividades acadêmicas, especialmente para **Patrícia**, **Iara**, **Bernadete**, **Maria** e **Marcelo**, pelo auxílio neste trabalho.

Aqueles que não mencionei, mas, que de alguma, forma colaboraram com a realização deste trabalho e com meu desenvolvimento científico e pessoal, incluo, pela emoção, na oração de agradecimento a Deus por tudo o que me foi permitido utilizar, verificar e conhecer.

RESUMO

Apesar da grande melhora nos resultados de desenvolvimento embrionário *in vitro*, cerca de 40% dos oócitos bovinos fecundados não completam o desenvolvimento na fase de pré-implantação. Diversos fatores estão relacionados a este fenômeno, conhecido como bloqueio do desenvolvimento embrionário. Partindo da premissa que o bloqueio no desenvolvimento ocorre normalmente, durante a ativação do genoma embrionário, aproximadamente, no 4º ciclo celular em bovinos, formulou-se a hipótese de que os genes transcritos no momento da ativação do genoma embrionário estão relacionados ao bloqueio. Nesta tese, um sistema fluorescente de *Differential Display* PCR (DDPCR) foi desenvolvido para isolar e identificar fragmentos de mRNAs expressos diferencialmente entre embriões que se desenvolvem mais rápido e com melhor taxa de desenvolvimento e aqueles que apresentam desenvolvimento mais lento e com maior taxa de bloqueio. Dentre 176 fragmentos recuperados, 27 foram clonados, sequenciados e 30 genes identificados. Dois genes, PI3K e ITM2B foram quantificados pela PCR em tempo real. Os resultados sugerem que duas diferentes ativações do genoma podem estar ocorrendo: o grupo de desenvolvimento rápido ativa genes ligados ao desenvolvimento embrionário e, o grupo lento ativa os genes ligados à sobrevivência ou morte celular.

Palavras-chave: embriões bovinos, DDPCR, Genoma – ativação, Genoma – bloqueio

ABSTRACT

The embryonic developmental block occurs at the 8-cell stage in bovine and is characterized for a lengthening of the cell cycle. At the same stage, also takes place the maternal-embryonic transition (i.e. the activation of the embryonic genome). These events are highly correlated and many genes are activated at the 4th cell cycle however, their functions are mostly unknown. The study of gene expression during this stage will help understand the mechanisms involved in the maternal-embryonic transition and ultimately lead to improvements of *in vitro* embryo production rates. The aim of this study was to identify genes differentially expressed between bovine embryos with or without developmental competence to reach the blastocyst stage, using Differential Display PCR methodology. Embryos with fast cleavage divisions showing 8 cells at 48 hpi and high potential of development (R8), and embryos with slow cleavage divisions showing 4 cells at 48hpi (L4) and 8 cells at 80 hpi (L8), both with reduced rates of development to blastocyst, were analyzed. We developed an alternative protocol for amplification and recovery of differentially expressed genes from extremely small initial amounts of RNA (10 to 25 pg of mRNA) from preimplantation bovine embryos without need of radio-isotopes. A total of 176 differentially expressed bands were recovered, 27 isolated-fragments were cloned and sequenced confirming the expected primer sequences and allowing the recognition identification of 30 gene transcripts related to bovine embryonic physiology. Two genes, PI3K and ITM2B were chosen for relative quantification of mRNA using Real-Time PCR. Results suggest two different embryonic genome activation mechanisms: fast-developing embryos activate genes related to embryonic development, and slow-developing embryos activate genes related to cellular survival and/or death.

Key words: Differential Display PCR, bovine embryo, genome activation, developmental block.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA I.1. Desenvolvimento embrionário bovino no período pré-implantação e respectivas etapas da produção *in vitro*. A fase que antecede a fecundação é determinante para a competência do oócito, é neste momento que estoques maternos de RNAs e proteínas, sintetizados durante a oogênese, irão contribuir para ativação do genoma embrionário, que ocorre no 4º ciclo celular (Adaptado de LONERGAN et al., 2003).23

FIGURA II.1. Otimização da Differential display PCR. (A) Efeito da quantidade de cDNA nas reações de amplificação: e = 1, 1,5 e 2 embriões e c = 200 ng RNA total de células da granulosa; (B) Efeito da concentração de MgCl₂ na reação de amplificação: 1, 2, 3 = diferentes grupos de embriões R8 amplificados em duplicata; (C) Duas etapas de amplificação e variação de MgCl₂ realizada em triplicata utilizando 1 e 1,5 embriões por reação. (Notar que nestas condições os resultados se mostraram consistentes).34

FIGURA II.2. Exemplo de um experimento de DDPCR mostrando (A) amplificação diferencial dos grupos de embriões bovinos com alto (R8) e baixo (L4 e L8) potencial de desenvolvimento em triplicata; (B) Gel de poliacrilamida após recuperação das bandas selecionadas.35

FIGURA II.3. Seqüência ilustrativa de produto de DDPCR após clonagem e sequenciamento. Primer arbitrário (5') e primer âncora com fragmento T7 (3') estão sublinhados.36

FIGURA III.1. Microscopia dos grupos experimentais de embriões bovinos produzidos *in vitro*. (A) Imagem característica de um embrião 8 células dos grupos R8 e L8 (48 e 90 hpi, respectivamente); (B) Imagem característica de um embrião 4 células do grupo L4 (48 hpi).42

FIGURA III.2. Desenho esquemático do experimento: os embriões foram produzidos *in vitro* e separados segundo a sua velocidade de desenvolvimento até o 3º ou 4º ciclo celular. Três grupos foram formados pelos embriões de desenvolvimento Rápido (R8) e Lento (L4 e L8) e submetidos a DDPCR para identificar genes envolvidos no bloqueio embrionário. Os cDNA de transcritos presentes ou ausentes em pelo menos um dos grupos foram clonados, seqüenciados e comparados com outras seqüências do NCBI com o programa Blast.44

FIGURA III.3. Porcentagem de fragmentos isolados pela técnica de Differential Display PCR de embriões de desenvolvimento rápido (R8) e lento (L4 e L8). Fragmentos ausentes em pelo menos um dos grupos também foram isolados.43

FIGURA III.4. Curvas de amplificação da quantificação relativa, por PCR em tempo real, da PI3K (rosa) e do controle endógeno rRNA18S (azul), nos embriões bovinos com desenvolvimento Rápido (R8) e Lento (L4 e L8)48

FIGURA III.5. Diferença na expressão relativa média da PI3K nos embriões bovinos com desenvolvimento Rápido (R8) e Lento (L4 e L8), quantificado por PCR em tempo real. No detalhe, está representada a expressão relativa média da PI3K em função da cinética de desenvolvimento para embriões rápidos (R) e lentos (L). *p<0,05 e **p<0,01.53

FIGURA III.6. Curvas de amplificação da quantificação relativa, por PCR em tempo real, da ITM2B (azul) e do controle endógeno rRNA18S (preto), nos embriões bovinos com desenvolvimento Rápido (R8) e Lento (L4 e L8).55

FIGURA III.7. Diferença na expressão relativa média da ITM2B nos embriões bovinos com desenvolvimento Rápido (R8) e Lento (L4 e L8), quantificado por PCR em tempo real. No detalhe, está representada a expressão relativa média da ITM2B em função do tempo de cultivo. Embriões rápidos (R8) e lentos (L4) apresentam 48hpi de cultivo e embriões lentos (L8) 90hpi. *p<0,05 e **p<0,01.56

FIGURA III.8. Sinalização apoptótica após estímulo intracelular em células T. Como demonstrado por Fleischer et al. (2002), após a privação de IL-2, aumenta a quantidade de ITM2B associado à mitocôndria. A interação de ITM2B com Bcl-2 favorece a morte celular quelando Bcl-2 e promovendo dimerização de Bax (adaptado de Joza et al. 2002). Da mesma forma, a PI3K pode estar agindo na sobrevivência celular favorecendo a fosforilação de BAD.....57

FIGURA IV.1. Sinalização da enzima PI3K. A figura ilustra as moléculas que ativadas pela PI3K fosforilada, desencadeiam uma série de processos importantes para a célula. O envolvimento da PI3K na sobrevivência, ciclo celular e transcrição são algumas das funções da molécula que, entre outras, despertam o interesse no desenvolvimento e bloqueio embrionário em bovinos e que podem ser estudados neste modelo (Figura adaptada de WYMAN et al., 2003).....62

FIGURA IV.2. Classificação dos oócitos bovinos: (A) *cumulus* completo e compacto; (B) *cumulus* parcial e compacto; (C) *cumulus* expandido e (D) ausência de *cumulus*.....66

FIGURA IV.3. Amplificação de parte da seqüência da PI3K em oócitos classificados de acordo com as células do *cumulus* (qualidades de oócitos de A–D) e em embriões bovinos R8, L4 e L8. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.70

FIGURA IV.4. Intensidade de fluorescência dos fragmentos amplificados da PI3K (453pb, 290pb e heterodímero) em oócitos classificados como: (A) *cumulus* completo e compacto; (B) *cumulus* parcial e compacto; (C) *cumulus* expandido e (D) ausência de *cumulus*. Todos os oócitos foram desnudados para a extração do RNA. Seta indica a subunidade catalítica *p110 alfa* de 453pb71

FIGURA IV.5. Intensidade de fluorescência dos fragmentos amplificados da PI3K (453pb, 290pb e heterodímero) em embriões bovinos de desenvolvimento rápido (R8) e lento (L4e L8). Seta indica a subunidade catalítica *p110 alfa* de 453pb.72

FIGURA IV.6. Diferença na expressão relativa média da PI3K nos embriões bovinos com desenvolvimento Rápido (R8) e Lento (L4 e L8), quantificado por PCR em tempo real. No detalhe, está representada a expressão relativa média da PI3K em função da cinética de desenvolvimento para embriões rápidos (R) e lentos (L). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ 73

FIGURA IV.7. Sinalização PI3K/Akt. PI3K ativada cataliza a conversão de Fosfoinositídeo bifosfato (PtdIns-4,5- P_2) em Fosfoinositídeo trifosfato (PtdIns-3,4,5- P_3). Estes lipídeos recrutam proteína Akt (PKB) e PDK1 para a membrana plasmática. Akt é, então, fosforilado e ativado por PDK, com isso PKB confirma seu papel como regulador de uma variedade de funções celulares, incluindo regulação do ciclo celular (Ciclina D1) e prevenção de apoptose (BAD). PTEN, antagonizador da sinalização PI3K, age defosforilando PtdIns-4,5- P_2 e PtdIns-3,4,5- P_3 . No nosso modelo de estudo, o aumento da concentração da PI3K pode estar ligada ao bloqueio (Ciclina) e apoptose (BAD). Adaptado de Franke e Cantley (1997). 75

FIGURA V.1. Comparação da expressão relativa média da PI3K e ITM2B nos grupos de desenvolvimento rápido (R8) e lentos (L4 e L8). 79

FIGURA V.2. Modelo biológico hipotético da ação da PI3K e da ITM2B em embriões com alto e baixo potencial de desenvolvimento a blastocisto. Embriões com alto potencial (R8) apresentam expressão equilibrada de PI3K e ITM2B. A ativação da PI3K neste grupo age na manutenção da vida embrionária ao longo do desenvolvimento. Embriões com baixo potencial (L8), apresentam alta expressão de ITM2B, promovendo a formação de dímeros de BAX e desencadeando a cascata de caspases no processo de apoptose. Embriões L4, embora tenha sido evidenciada uma maior expressão de PI3K em relação ao grupo R8, estes embriões podem estar sujeitos a bloqueio pela ação da PI3K ativando AKT que, por sua vez, não fosforila BAD ou, então, pela maior expressão da ITM2B, em processo semelhante a embriões L8. 80

LISTA DE TABELAS

TABELA II.1. Primers utilizados no método DDPCR.	30
--	----

TABELA III.1. Descrição dos fragmentos isolados pelo sistema de <i>Differential Display</i> PCR, clonados e submetidos ao sequenciamento.	50
---	----

TABELA III.2. Eficiência de amplificação dos genes identificados por <i>Differential Display</i> PCR, Controle Endógeno (CE) e expressão relativa média em embriões bovinos de desenvolvimento rápido e lento.	56
--	----

TABELA III.3. Resumo das principais funções de outros genes identificados por <i>Differential Display</i> PCR em embriões bovinos de desenvolvimento rápido e lento.	58
--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – ATIVAÇÃO DO GENOMA EMBRIONÁRIO E BLOQUEIO DO DESENVOLVIMENTO EM BOVINOS	15
1. Introdução	16
1.1. Hipótese.....	19
1.2. Objetivos gerais	19
2. Revisão de Literatura	20
2.1. Período pré-implantacional de embriões bovinos	20
2.2. Ativação e bloqueio do genoma embrionário (AGE) em bovinos	21
 CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE UM SISTEMA FLUORESCENTE DE “DIFFERENTIAL DISPLAY PCR” PARA O ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO...	25
Resumo	26
1. Introdução e Revisão de Literatura	27
1.1. Hipótese.....	28
1.2. Objetivos.....	28
2. Material e Métodos	29
2.1. Produção in vitro de embriões bovinos	29
2.2. Extração do RNA e transcrição reversa.....	29
2.3. Técnica de Differential Display PCR Fluorescente	30
2.3.1. Padronização da Técnica	30
2.3.2. <i>Differential Display</i> PCR Fluorescente em embriões bovinos ..	31
2.3.2.1. Eletroforese, identificação e recuperação dos fragmentos expressos diferencialmente.....	31
2.4. Sequenciamento direto dos fragmentos re-amplificados	32
2.5. Clonagem e Sequenciamento dos fragmentos re-amplificados	32
3. Resultados e Discussão	33

CAPÍTULO III – IDENTIFICAÇÃO DE GENES EXPRESSOS EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO POR “DIFFERENTIAL DISPLAY PCR” . 37

Resumo	38
1. Introdução e Revisão de Literatura	39
1.1. Hipótese.....	40
1.2. Objetivos.....	40
2. Material e Métodos	41
2.1. Produção in vitro de embriões bovinos	41
2.1.1. Maturação in vitro (MIV)	41
2.1.2. Fertilização in vitro (FIV).....	41
2.1.3. Cultivo in vitro (CIV) e separação dos grupos experimentais.....	42
2.2. Técnica de Differential Display PCR Fluorescente	43
2.3. Confirmação da expressão diferencial.....	45
2.3.1. Caracterização do perfil de expressão dos genes isolados por PCR em tempo real	45
2.4. Análise dos dados	45
2.4.1. Análise estatística	46
3. Resultados e Discussão	47

CAPÍTULO IV – PI3K NO DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO 59

Resumo	60
1. Introdução e Revisão de Literatura	61
1.1. Hipótese.....	64
1.2. Objetivos.....	64
2. Material e Métodos	65
2.1. Produção in vitro de embriões bovinos	65
2.2. Obtenção de oócitos bovinos.....	65
2.3. Extração do RNA e RT-PCR.....	66
2.4. Amplificação da PI3K em oócitos e embriões bovinos.....	66
2.5. Confirmação da expressão diferencial.....	67

2.6. Caracterização do Perfil de Expressão dos Genes Isolados com o PCR em tempo real.....	67
2.7. Análise dos dados.....	68
2.7.1. Análise estatística	68
3. Resultados e Discussão	69
3.1. Modelo de sinalização da PI3K.....	75
 CAPÍTULO V – RESUMO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL.....	76
1. Resumo dos Resultados	77
2. Discussão geral	78
3. Modelo Biológico Hipotético	80
 CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES	81
 CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS	83

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1. Introdução

Desde a década de 80, embriões bovinos podem ser produzidos a partir de oócitos maturados (MIV), fertilizados (FIV) e cultivados (CIV) *in vitro* até os estágios de mórula e blastocisto (BRACKETT et al., 1982; LU et al., 1987). Embora essas técnicas estejam bastante consolidadas, apenas aproximadamente 30 a 40% dos oócitos fecundados atingem o estágio de blastocisto (TROUNSON et al., 1994; LONERGAN et al., 2003).

Vários fatores podem afetar o desenvolvimento dos embriões durante o período pré-implantação, entre eles, a qualidade dos oócitos selecionados e as condições de cultivo. Para melhorar os índices de produção, a concentração de sais, o pH dos meios de cultivo e a necessidade de diversos hormônios e fatores de crescimento têm sido empiricamente testados e otimizados permitindo um grande desenvolvimento nos sistemas de cultivo *in vitro* (EPPIG et al., 1998). Entretanto, estudos têm demonstrado que a qualidade do oócito é o fator fundamental para o sucesso da técnica de produção *in vitro* (LONERGAN et al., 2001; DIELEMAN et al., 2002; RIZOS et al., 2002).

Durante a oogênese, o oócito acumula grande quantidade de RNAs e proteínas capazes de regular e manter o desenvolvimento do embrião durante o período de pré-implantação (SCHULTZ et al., 1999; HYTELL et al., 1997; BREVINI-GANDOLFI e GANDOLFI, 2001), dentre eles, fatores transcricionais que estão envolvidos na ativação do genoma embrionário (AGE) (VIUFF et al., 1996).

O momento da AGE é variável de acordo com a espécie e normalmente ocorre por volta do estágio de 2 células em camundongos, 4 células em humanos e suínos, 8 células em bovinos e ovinos e 16 células em coelhos (TELFORD et al., 1990; BARNES e FIRST, 1991; SCHULTZ, 1993; DE SOUSA et al., 1998). Em bovinos, pesquisas demonstraram que, além dos genes expressos durante a AGE (LAVOIR et al., 1997), alguns genes são transcritos, embora em menos frequência, durante o período que antecede o 4º ciclo celular (SASAKI et al., 1998; DE SOUSA et al., 1998). A presença estimada de 15×10^3 de transcritos, durante o período pré-implantação, reflete a complexidade da embriogênese e a

falta de conhecimento existente sobre os genes envolvidos na AGE (WRENZYCKI et al., 2005).

No período da pré-implantação, que nos mamíferos compreende desde a formação do zigoto e ativação do genoma embrionário até o início da diferenciação celular, o embrião passa por uma série de alterações morfológicas e fisiológicas que são reguladas pela expressão diferencial de genes importantes (ZIMMERMANN e SCHULTZ, 1994; SCHULTZ et al., 1999). Nesta fase do desenvolvimento embrionário, dois parâmetros de desenvolvimento são indicativos de boa qualidade embrionária: o rápido desenvolvimento e o baixo grau de fragmentação. Existem evidências de genes que são responsáveis pelo controle de ambas características (WARNER et al. 1998). Efeitos individuais de touros e vacas podem afetar negativamente os índices de embriões produzidos *in vitro* que atingem o estágio de blastocisto (LÔBO et al., 1999; WATANABE et al., 1999a; WATANABE et al., 1999b), sendo que as taxas de insucesso podem ter duas causas principais: problemas na fecundação e/ou no momento da ativação do genoma, levando ao bloqueio embrionário no estágio de 8 células (DE SOUSA et al., 1998b).

O bloqueio do desenvolvimento ocorre no ciclo celular de maior duração no período de pré-implantação, e também coincide com o início da transcrição do genoma embrionário, pois até então, a maioria do RNA existente no embrião foi produzida durante a oogênese (PIKÓ et al., 1970; TELFORD et al., 1990).

Muitas questões básicas a respeito da genômica embrionária precisam ser esclarecidas para auxiliar no avanço das tecnologias de produção de embriões *in vitro* (PIV). Por exemplo, como os transcritos herdados maternalmente podem controlar o desenvolvimento embrionário? Quais fatores transcricionais são responsáveis pela competência oocitária? Quais os primeiros genes a serem transcritos? As respostas para estas questões favorecerão compreender os processos biológicos envolvidos no desenvolvimento e, conseqüentemente, melhorar, qualitativamente e quantitativamente, a PIV de embriões bovinos (DE SOUSA et al., 1998).

Presume-se que a incapacidade de vencer o ambiente de repressão transcricional gerado por fatores estruturais do genoma, como por exemplo, o empacotamento do DNA, a acetilação, a hiperacetilação e a metilação, seja um dos fatores que determine a incompetência do embrião em ultrapassar os primeiros ciclos celulares (LAVOIR et al., 1997). A ativação da transcrição embrionária também é um fator vital para que o embrião em desenvolvimento seja capaz de passar pelas primeiras divisões celulares. Experimentos com a utilização de drogas que promovem inibição transcricional, como a alfa-amanitina, durante o 4º ciclo celular de embriões bovinos, geram o bloqueio em 100% dos casos (SMITH et al., 1995).

Uma variabilidade no tempo para atingir o 4º ciclo celular foi observada no desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos (DE SOUSA et al., 1998a). Smith et al. (1995) observaram que embriões que atingem o estágio de 8 células mais rapidamente têm maior competência para desenvolver até o estágio de blastocisto. Com base nestas evidências, Watanabe et al. (2002) desenvolveram um sistema que permite distinguir embriões de desenvolvimento rápido, que atingem o 4º ciclo com 48 horas pós-inseminação (hpi) e com melhores taxas de desenvolvimento a blastocisto ($58,8 \pm 0,4\%$), de embriões que apresentam desenvolvimento lento e atingem o 4º ciclo de 49 a 90 hpi, ($34,4 \pm 0,7\%$). No grupo de embriões lentos, com menor potencial de desenvolvimento a blastocisto foi verificada uma alta taxa de bloqueio.

Neste trabalho, com a utilização de metodologias moleculares como o *Differential Display* PCR (DDPCR) e PCR em tempo real, a presença e a frequência de parte dos transcritos de genes presentes no período pré-implantacional em bovinos foi investigada visando o entendimento dos processos biológicos envolvidos na ativação e bloqueio do desenvolvimento embrionário.

1.1. Hipótese

Considerando que a ativação do genoma embrionário bovino tem início durante o 4º ciclo celular, fase que também é caracterizada pelo bloqueio no desenvolvimento, formulou-se a hipótese de que existem genes transcritos diferencialmente em embriões com alto e baixo potencial de desenvolvimento que são responsáveis pela competência embrionária e que também estão associados ao bloqueio do desenvolvimento.

1.2. Objetivos gerais

Utilizando embriões produzidos e classificados segundo o modelo descrito por Watanabe et al. (2002), ou seja, embriões com desenvolvimento rápido e lento apresentando 8 células com 48 hpi (R8) e 90 hpi (L8), respectivamente e embriões de desenvolvimento lento com 4 células 48 hpi (L4), nossos objetivos foram:

- Desenvolver um protocolo alternativo para a técnica de *Differential Display PCR* capaz de amplificar, isolar e identificar transcritos expressos diferencialmente nos grupos de embriões bovinos com alto ou baixo potencial de desenvolvimento até blastocisto, tendo como base a cinética do desenvolvimento embrionário.
- Estimar a frequência do mRNA de parte dos genes expressos diferencialmente nos diferentes grupos de embriões e testar suas relações com o bloqueio embrionário e outros eventos neste modelo.
- Dar início a estudos visando determinar as funções dos genes isolados pelo DDPCR durante o desenvolvimento embrionário.

2. Revisão de Literatura

2.1. Período pré-implantacional de embriões bovinos

Nos mamíferos, o período pré-implantação está compreendido entre a formação do zigoto até pouco além do estágio de blastocisto. Este período do desenvolvimento é caracterizado por quatro etapas biológicas distintas que ocorrem após a fertilização do oócito e incluem desde a (I) primeira clivagem, (II) transição materno-zigótica (MZT) ou ativação do genoma embrionário (AGE), (III) a compactação e conseqüente formação da polarização do epitélio embrionário e (IV) a diferenciação de mórula em blastocisto (SCHULTZ et al., 1999; WRENZYCKI et al., 2005), sendo que cada uma destas etapas é acompanhada por mudanças no padrão de expressão gênica (WARNER e BRENNER, 2001).

Em geral, o potencial de desenvolvimento embrionário está associado a características intrínsecas do oócito como: o folículo de origem, morfologia, estado de poliadenilação e cinética das primeiras clivagens (BREVINI et al., 2002; LONERGAN et al., 2003; MEIRELLES et al., 2004), além das interações com os sistemas de cultivo (NIEMANN e WRENZYCKI, 2000; WATSON et al., 2000; NATALE et al., 2001; NIEMANN e WRENZYCKI, 2003; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2004).

Evidências de que o tamanho do folículo de origem do oócito é um fator determinante para o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto indicam que oócitos derivados de folículos maiores que 3 mm são mais competentes do que aqueles derivados de folículos menores que 2 mm de diâmetro (PAVLOK et al., 1992, 1993; LONERGAN et al., 1994).

A cinética das primeiras clivagens tem sido estudada em várias espécies e os fatores que a influenciam ainda não estão bem esclarecidos (BAVISTER et al., 1983; TOTEY et al., 1996; HOLM et al., 1998, LONERGAN et al., 2000, HOLM et al., 2002). Em embriões bovinos maturados e fertilizados in vitro, a velocidade das primeiras clivagens é variável e dependente não apenas da qualidade do oócito, mas do espermatozóide e dos meios de cultivo (DE SOUSA et al., 1998). Tem

sido demonstrado que embriões que concluem mais rapidamente o primeiro ciclo celular, têm maior potencial de desenvolvimento comparado a embriões que concluem mais lentamente (DYNNESE et al., 1999; LONERGAN et al., 1999). Esta evidência é válida, não somente para a cinética do desenvolvimento embrionário, mas também para a cinética de maturação e extrusão do primeiro corpúsculo polar (SIRARD et al., 1989; DOMINKO e FIRST, 1997; LONERGAN et al., 1997; WARD et al., 2002).

Em camundongos, a expressão do gene PED (do inglês, Pre-implantation Embryo Development), que controla o desenvolvimento e sobrevivência do embrião no período de pré-implantação, tem sido estudada por apresentar uma correlação positiva com a cinética do desenvolvimento (GOLDBARD et al., 1982; WARNER et al., 1998; WU et al., 1999). Em bovinos, um possível gene homólogo ao PED foi caracterizado durante a fase de pré-implantação mostrando que a abundância de transcritos deste gene está associada a embriões de alta qualidade e com melhor potencial de desenvolvimento (FAIR et al., 2004).

Brevini et al. (1999) e Brevini-Gandolfi et al. (2002) verificaram que o estado de poliadenilação dos genes transcritos no início do desenvolvimento está relacionado à competência de desenvolvimento embrionário e a velocidade da primeira clivagem. A baixa competência de desenvolvimento embrionário é acompanhada pela quantidade de mRNAs maternos específicos, bem como pelo nível anormal de poliadenilação. Durante o processo de crescimento e maturação do oócito, as moléculas de RNA e de proteínas são sintetizadas e estocadas visando manter o início do desenvolvimento embrionário (TELFORD et al., 1990). Sequências específicas localizadas na região 3' não traduzida (3'UTR) do mRNA garantem a poliadenilação e estabilidade dessas moléculas, permitindo que elas sejam estocadas sem que haja degradação (MENDEZ e RICHTER, 2001).

2.2. Ativação e bloqueio do genoma embrionário (AGE) em bovinos

Com as possibilidades de estudos geradas pela biologia molecular e conseqüente utilização de metodologias como o Differential Display PCR,

Bibliotecas subtrativas, microarranjos e PCR em tempo real, genes que apresentam expressão diferencial em estágios específicos do desenvolvimento do oócito ou do embrião têm sido identificados e estudados (NIEMANN e WRENZYCKI, 2000; EL-HALAWANY et al., 2004). Esses estudos apresentam grande potencial para auxiliar no entendimento dos mecanismos básicos do desenvolvimento embrionário (WATSON et al., 1999).

Nos mamíferos, a ativação da transcrição do genoma embrionário (AGE) é um processo complexo e consiste de uma série de eventos nucleares e citoplasmáticos essenciais para o desenvolvimento normal da embriogênese. Nesta fase, protaminas são substituídas por histonas, o genoma parental haplóide metilado passa por demetilação e formação do zigoto diplóide e o controle materno do processo de desenvolvimento é gradualmente substituído pelo controle embrionário (AO et al., 1994; HYTELL et al., 1997; SCHULTZ et al., 1999; WATSON et al., 1999; BREVINI-GANDOLFI e GANDOLFI, 2001; KAŇKA, 2003).

O momento da AGE é variável de acordo com a espécie e normalmente ocorre no estágio de 2 células em camundongos, 4 células em humanos e suínos, 8 células em bovinos e ovinos e 16 células em coelhos (BARNES e FIRST, 1991; TELFORD et al., 1990; DE SOUSA et al., 1998). A utilização de inibidores transcricionais, como alfa-amanitina, no início do desenvolvimento embrionário mostrou que os embriões conseguem se desenvolver até o ciclo celular caracterizado pelo bloqueio. Este período de “independência” do desenvolvimento geralmente culmina com o momento da AGE (TELFORD et al., 1990; PLANTE et al., 1994; MEMILI e FIRST, 2000; NATALE et al., 2000) e reforça as evidências de que, genes maternos ativados em estágios anteriores a AGE mantêm o desenvolvimento embrionário (BACHVAROVA, 1992; MEMILI et al., 1998). Em camundongos e bovinos, estudos com [3H]uridina mostraram atividade transcricional em 1 e 4 células, respectivamente. Entretanto, em camundongos a tradução destes transcritos não foi verificada antes do estágio de 2 células (DAVIS e SCHULTZ, 1997; MEMILI et al., 1998).

FIGURA I.1. Desenvolvimento embrionário bovino no período pré-implantação e respectivas etapas da produção *in vitro*. A fase que antecede a fecundação é determinante para a competência do oócito, é neste momento que estoques maternos de RNAs e proteínas, sintetizados durante a oogênese, irão contribuir para ativação do genoma embrionário, que ocorre no 4º ciclo celular (Adaptado de LONERGAN et al., 2003).

Como exposto anteriormente, o oócito bovino é portador de mensagens (mRNA e Proteínas) para manter o desenvolvimento do embrião durante as primeiras clivagens e ativar o seu genoma. Entretanto, sabe-se que em embriões bovinos produzidos *in vitro* as taxas de falhas no desenvolvimento são altas e quase sempre associadas a fatores intrínsecos ao oócito e que conduzem ao bloqueio e morte embrionária (WARNER et al., 1998; LONERGAN et al., 2003; MEIRELLES et al., 2003; 2004).

O bloqueio embrionário tem sido consensualmente considerado um evento causado por um mecanismo passivo, gerado pela exaustão de reservas maternas de mRNA e proteínas, levando a ausência de informações importantes para manutenção do desenvolvimento ou início da AGE (QIU et al., 2003; VIGNEAULT et al., 2004). Entretanto, acredita-se que uma das funções primárias da ativação do genoma embrionário é a prevenção da morte celular programada (MCP), uma vez que o oócito apresenta informações capazes de ativar esse mecanismo de morte celular quando não fertilizado (JURISICOVA et al., 1998) e eliminar as

células foliculares pela via da MCP (WARNER et al., 1998; DALBIËS-TRAN e MERMILLOD, 2003).

A expressão diferencial de genes pró e anti-apoptóticos foi verificada em estágios específicos do desenvolvimento de embriões murinos no período pré-implantação (JURISICOVA et al., 1998). Autores sugerem que a incapacidade do embrião em manter o balanço entre fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos presentes nos citoplasmas herdados leve ao início da cascata de apoptose que culmina no bloqueio do desenvolvimento e morte do embrião (MEIRELLES et al., 2003; 2004). Desta maneira, o modelo proposto nesta tese permite compreender a relação da presença ou ausência de transcrição de genes envolvidos no processo de bloqueio e morte embrionário durante o período pré-implantação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE UM SISTEMA FLUORESCENTE DE “DIFFERENTIAL DISPLAY PCR” PARA O ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO

Resumo

A técnica de *Differential Display* PCR tem sido amplamente utilizada para identificar genes diferencialmente expressos entre amostras biologicamente distintas. Foi desenvolvido um protocolo alternativo para amplificação e recuperação de genes diferencialmente expressos utilizando quantidades mínimas de RNA inicial (10 a 25 pg de mRNA) extraídos de embriões bovinos na fase de pré-implantação. Os cDNAs produzidos com um primer âncora associado a uma sequência universal são amplificados com um primer arbitrário e um fluorescente. Os produtos de amplificação podem ser visualizados com scanner de fluorescência, sem a necessidade de rádio-isótopos. Dezenove fragmentos isolados foram clonados e seqüenciados confirmando a seqüências esperadas dos primers e permitindo o reconhecimento de genes transcritos relacionados à fisiologia embrionária.

Palavras-chave: *Differential Display* PCR, fluorescência, primer universal, embriões bovinos.

1. Introdução e Revisão de Literatura

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a identificação de genes expressos diferencialmente entre duas ou mais amostras biológicas distintas, entre as quais destacam-se a SSH (Hibridização Supressiva Subtrativa, DIATCHENKO et al., 1996), a DDPCR (Differential Display PCR, LIANG e PARDEE, 1992), a SAGE (Análise Serial de Expressão Gênica, VELCULESCU et al., 1995) e os Microarrays (Microarranjos, SCHENA et al., 1995). Estas técnicas necessitam de grandes quantidades de RNA, exceto a DDPCR, que é amplamente utilizada para a identificação de transcritos novos ou raros especialmente nos casos em que as quantidades de RNA são bastante limitadas como, por exemplo, no início do desenvolvimento de embriões bovinos. (NATALE et al., 2001; MINAMI et al., 2001; LI et al., 2003; TESFAYE et al., 2003; KANKA et al., 2003).

A metodologia de DDPCR originalmente descrita consiste na produção de cDNA a partir de subgrupos de mRNA transcritos reversamente com a utilização de diferentes primers ancorados na cauda poliadenilada do mRNA, amplificação do cDNA com primers arbitrários e incorporação de marcação radioativa e eletroforese em gel de poliacrilamida. Várias modificações no protocolo original têm sido relatadas na tentativa de minimizar sinais falso-positivos (SUNG e DENMAN, 1997; LUCE e PETER, 1998; MIELE et al. 1998; NAGEL et al. 1999), aumentar a eficiência da técnica com a utilização de diferentes desenhos de primers (ZHAO et al., 1998; VERCA et al., 1998; WANG et al., 1998) e eliminar a necessidade de utilizar radioatividade (ITO et al., 1994; LUEHRSEN et al., 1997; CHO et al., 2001; STEIN e LIANG, 2002).

DDPCR com primers fluorescentes ou com a incorporação de dNTPs marcados têm sido amplamente utilizados em substituição a procedimentos radioativos. Smith et al. (1997) descrevem uma metodologia que utiliza um primer universal associado ao poli T durante a produção do cDNA. Um primer marcado com fluorescência que compartilha a sequência do primer universal do cDNA é utilizado em conjunto com primers aleatórios na reação de Differential Display PCR. Neste procedimento, um seqüenciador de DNA é necessário para analisar

os produtos amplificados e recuperação dos fragmentos só é possível após a repetição deste mesmo processo com radioatividade.

1.1. Hipótese

Utilizando quantidades reduzidas de mRNA e marcação com fluorescência, é possível isolar, recuperar e identificar genes expressos diferencialmente em amostras distintas.

1.2. Objetivo

Neste capítulo, é descrito um protocolo alternativo para DDPCR que permite a amplificação e recuperação de genes expressos diferencialmente a partir de amostras extremamente reduzidas de RNA total (10 a 25 pg de mRNA) a partir de grupos de embriões bovinos de 4 e 8 células, utilizando um primer universal marcado com fluorescência que permite eliminar a utilização de isótopos radioativos.

2. Material e Métodos

2.1. Produção *in vitro* de embriões bovinos

Embriões bovinos foram produzidos *in vitro* após a maturação dos oócitos, fertilização e cultivo de acordo com protocolos publicados por Bousquet et al. (1999). Três grupos diferentes foram utilizados com base na cinética do desenvolvimento: embriões 4 e 8 células, ou seja, embriões lentos (L4) e rápidos (R8) recuperados às 48 horas pós-inseminação (hpi) e, embriões lentos 8 células (L8), recuperados às 90 hpi. Os embriões foram retirados do cultivo, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C até o momento da extração do RNA.

2.2. Extração do RNA e transcrição reversa

O RNA foi extraído de 50 embriões congelados de cada categoria (R8, L4 e L8), com o kit Rneasy (Qiagen, Germany) de acordo com as instruções do fabricante e diluído em 30 µl de água livre de RNAses.

Nove microlitros do RNA total de cada grupo de embriões, o equivalente a 10 pg, foram transcritos reversamente em reações de 20 µl contendo: 1 µl de *SuperScript* III (Invitrogen™) (200U/µl), 1µl de primer âncora 5'- AAT ACG ACT CAC TAT AGT (T)₁₂NN- 3' (NN = GC, GA ou GG; Tabela 1) (5 µM), 2 µl de dNTPs (2,5 mM cada), 2 µl de DTT (0,1 M), 1 µl de RNaseOUT® (40 U/µl; Invitrogen™) e 4 µl de tampão 5X. As reações foram realizadas a 42°C por 15 min, 50°C por 50 min e 70°C por 15 min para inativação da enzima.

De acordo com a técnica original de *Differential Display* PCR, as combinações de duas bases (neste trabalho, GC, GA ou GG) adicionadas à porção 3' dos primers âncora, tem a função de subdividir a população de mRNAs que é reversa-transcrita em cDNA, permitindo assim, uma melhor resolução dos fragmentos amplificados durante a eletroforese.

2.3. Técnica de *Differential Display* PCR Fluorescente

2.3.1. Padronização da Técnica

Amostras de cDNA de embriões R8, produzidas com um primer âncora, foram utilizadas em amplificações com um dos 20 primers arbitrários (decâmeros) e primer T7 marcado (Tabela II.1). A quantidade de cDNA necessária para o bom funcionamento da reação de amplificação foi avaliada utilizando-se 10, 15 e 20 pg de mRNA em cada reação, o que é equivalente a 1, 1,5 e 2 embriões, respectivamente, de acordo com Zimmermann e Schultz (1994) e Pikó e Clegg (1982). Além disto, foram utilizadas, aproximadamente, 200ng de RNA total de células da granulosa como controle das reações realizadas com os grupos de embriões. Três concentrações de $MgCl_2$ (2, 3 e 4 mM) e variações de $MgCl_2$ dentre dois protocolos de ciclagens também foram testados, sendo 10 ciclos de amplificação contendo 1,0 mM e 25 ciclos contendo 3,5 mM de $MgCl_2$.

TABELA II.1. Primers utilizados no método DDPCR.

Primer	Seqüência 5' → 3'	Primer	Seqüência 5' → 3'
Universal T7	AATACGACTCACTATAGT	ARP9	TAAGACTAGC
AP1	AATACGACTCACTATAGT ₍₁₂₎ GA	ARP10	GATCTCAGAC
AP2	AATACGACTCACTATAGT ₍₁₂₎ GC	ARP11	ACGCTAGTGT
AP3	AATACGACTCACTATAGT ₍₁₂₎ GG	ARP12	GGTACTAAGG
ARP1	CGACTCCAAG	ARP13	GTTGCACCAT
ARP2	GCTAGCATGG	ARP14	TCCATGACTC
ARP3	GACCATTGCA	ARP15	CTTTCTACCC
ARP4	GCTAGCAGAC	ARP16	TCGGTCATAG
ARP5	ATGGTAGTCT	ARP17	CTGCTAGGTA
ARP6	TACAACGAGG	ARP18	TGATGCTACC
ARP7	TGGATTGGTC	ARP19	TTTTGGCTCC
ARP8	TGGTAAAGGG	ARP20	TCGATACAGG

2.3.2. *Differential Display* PCR Fluorescente em embriões bovinos

As amostras de cDNA de cada grupo de embriões (R8, L4 e L8), produzidas com cada um dos três primers âncora, foram utilizadas em amplificações com cada um dos 20 primers arbitrários (decâmeros) e primer T7 marcado.

As amplificações foram realizadas em duas etapas: uma primeira amplificação realizada em 10 ciclos contendo 1,33 µl de produtos de RT-PCR (o equivalente a 15 pg de mRNA inicial), 1 µl de tampão 10X, 2 µl de dNTPs (2.5 mM cada), 1.33 µl de TAMRA T7 (5 µM), 1.33 µl de primer arbitrário (5 µM), 0.1 µl de *Taq* DNA polimerase (5 U/µl; Invitrogen™) e 0.2 µl de MgCl₂ (50 mM). As condições de PCR foram: 95°C por 2 min, seguido por 10 ciclos de 92°C por 15 seg, 42°C por 30 seg e 72°C por 2 min, extensão final de 72°C por 10 min. Subseqüentemente, 10 µl de mix contendo 1.8 µl de MgCl₂ (50 mM) e a mesma quantidade dos outros componentes foram adicionados para uma segunda etapa de amplificação de 25 ciclos de 92°C por 15 seg, 42°C por 30 seg e 72°C por 2 min, extensão final de 72°C por 10 min.

2.3.2.1. Eletroforese, identificação e recuperação dos fragmentos expressos diferencialmente

Um total de 8 µl de cada amplificação foi desnaturado a 95°C por 2 min em 1.5 µl de tampão de carregamento (20 mM EDTA, 0,05% Xileno cianol, 95% formamida), resfriado em gelo e 6 µl foram separados em gel de poliacrilamida desnaturante 6.5% em TBE 1X por 5 horas a 1,500V após pré-corrida por 30 min a 1,500V. Após eletroforese, os fragmentos amplificados foram visualizados com scanner de fluorescência Fuji FLA3000G (Fuji Film) e pelos softwares Image Reader FLA-3000 Series versão 1.11 e Image Gauge versão 3.12 (Fuji Film). Após a remoção da placa de vidro superior, o gel foi desidratado a 80°C e lavado com água ultrapura até completa retirada da uréia. Os fragmentos diferencialmente expressos, amplificados entre os grupos de embriões rápidos e

lentos, foram isolados do gel de DDPCR com o auxílio de um bisturi, diluídos em água ultrapura à 80°C por 10 minutos e estocados a -80°C até o momento das análises.

2.4. Sequenciamento direto dos fragmentos re-amplificados

Cada fragmento isolado do gel foi re-amplificado com o primer T7 não-marcado e primer arbitrário correspondente. As reações de re-amplificação foram realizadas em 25 µl contendo 0,5 µl da solução com o fragmento diluído, 2,5 µl de tampão 10X da *Taq* DNA polimerase, 4 µl de dNTPs (2,5 mM cada), 3,25 µl de primer T7 não-marcado (5 µM), 3,25 µl primer arbitrário (5 µM), 0,2 µl de *Taq* DNA polimerase (5 U/µl) e 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM). As condições de termociclagem foram: 95°C por 2 min, seguido por 30 ciclos de 92°C por 15 seg, 42°C por 30 seg e 72°C por 2 min, com extensão final de 72°C por 5 min. Os produtos de re-amplificação foram purificados pelo *kit* GFX PCR DNA (Amershan Biosciences) e submetidos a sequenciamento direto com o dideoxi terminador BigDye (Applied Biosystems) em seqüenciador ABI Prism 377 DNA (Applied Biosystems). As seqüências foram submetidas ao BLAST (ALTSCHUL et al., 1990; 1997) para identificação no GenBank.

2.5. Clonagem e Sequenciamento dos fragmentos re-amplificados

As reações de re-amplificação e condições de termociclagem foram realizadas como descrito no item 2.4. Os fragmentos re-amplificados foram clonados em vetor TOPO TA (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante e seqüenciados com o Kit dideoxi terminador BigDye (Applied Biosystems). As seqüências foram submetidas ao BLAST (ALTSCHUL et al., 1990; 1997) para identificação no GenBank.

3. Resultados e Discussão

Embora várias modificações do protocolo original de DDPCR tenham sido realizadas desde sua primeira publicação, nosso objetivo foi desenvolver um procedimento que utilizasse pequenas quantidades de RNA inicial, aproximadamente 10 pg, e um primer fluorescente para detecção e isolamento de fragmentos expressos diferencialmente, eliminando a utilização de radioatividade. DDPCR utilizando primer universal marcado e detecção em sequenciador automático foi descrita anteriormente por Smith et al. (1997). Entretanto, esta estratégia necessita um segundo procedimento, utilizando radioatividade, para a recuperação dos fragmentos expressos diferencialmente.

Os resultados da padronização da técnica estão mostrados na Figura II.1. Bons resultados foram alcançados em reações contendo 1,33 µl de produtos de RT-PCR (o equivalente a 15 pg de mRNA inicial ou 1,5 embriões; Figura II.1 A), com 4,0 mM de MgCl₂ (Figura II.1 B). A combinação de duas etapas de amplificação sendo a primeira etapa realizada em 10 ciclos com 1,0 mM de MgCl₂ e a segunda em 25 ciclos com 3,0 mM de MgCl₂ possibilitou uma amplificação mais consistente no que se refere à reprodutibilidade das triplicatas (Figura II.1 C).

FIGURA II.1. Otimização da *Differential Display* PCR. (A) Efeito da quantidade de cDNA nas reações de amplificação: e = 1, 1,5 e 2 embriões e c = 200 ng RNA total de células da granulosa; (B) Efeito da concentração de $MgCl_2$ na reação de amplificação: 1, 2, 3 = diferentes grupos de embriões R8 amplificados em duplicata; (C) Duas etapas de amplificação e variação de $MgCl_2$ realizada em triplicata utilizando 1 e 1,5 embriões por reação. (Notar que nestas condições os resultados se mostraram consistentes).

Dezenas de fragmentos expressos diferencialmente foram identificados e recuperados nos três grupos de embriões bovinos em triplicata, utilizando os procedimentos descritos anteriormente (Figura II.2 A e B). A re-amplificação e o sequenciamento direto foram realizados e os resultados indicaram a presença de diferentes fragmentos com número de nucleotídeos similares que co-migram com as bandas de interesse, impossibilitando a análise dos fragmentos, como descrito anteriormente (BAUER et al. 1993). A partir destes resultados os sequenciamentos foram conduzidos após clonagem dos fragmentos em vetor plasmidial.

FIGURA II.2. Exemplo de um experimento de DDPCR mostrando (A) amplificação diferencial dos grupos de embriões bovinos com alto (R8) e baixo (L4 e L8) potencial de desenvolvimento em triplicata; (B) Gel de poliacrilamida após recuperação das bandas selecionadas.

Dezenove fragmentos isolados foram clonados e um total de 85 colônias diferentes foram seqüenciadas. Os resultados mostram claramente a estrutura da seqüência esperada para os produtos de DDPCR (por exemplo, primer âncora com T7 e primer arbitrário; Figura II.3). Em alguns casos, observamos a presença de 2 a 4 seqüências heterogêneas no mesmo fragmento de DDPCR isolado, mostrando que é necessário seqüenciar mais de uma colônia para a precisa identificação e caracterização de mRNA expressos diferencialmente. Pesquisas das seqüências obtidas no Blast mostraram similaridades a genes relacionados à fisiologia embrionária, bem como regiões do genoma bovino e/ou seqüências desconhecidas, mostrando claramente que os fragmentos amplificados não foram meramente artefatos de PCR e/ou derivados de contaminação acidental com outros ácidos ribonucléicos. Estes resultados são apresentados e discutidos em detalhes no capítulo III.

```

5' GCTAGCAGAC CAGAAGTGCC AGTCAGAGGC CCAGCAGCCT TCTGCCACCA TCTCCCAGCT
GCCAGTGGGT GCAAGTATGC CTCTGCCAAA CGCAAAGTGG AGGAAATGGA AGTGGACGAC
TTCTACGATG GGATCAAACG GCTCTATAAC GAAGATAACG CTTCCGAAAG TGTGGGTTCT
GTGTGTGGCA CTGATTTATC ACGGCAAGAG GGACAGGCTT CTCCTTGTC CACCTCTGCAG
CCTGTTTCTG TCACGTAGCT GCAAGAGTTA CCTTCAAGTG CAAACTAAGG TAGACGACTC
GGGATGGGAG CATGGAAAAC CAGGATAGGC TACGTAAGGT ATATATCTTT TCAGGCTGAT
TTGAAATGAG CCAGAGGAAA AAACCCAGTT GATTTGTATG ACTAATTATA ATTCAACAAT
ATTTAAGCAC TTAAAGACCA AAAAAAAAAA ACTATAGTGA GTCGTATT 3'

```

FIGURA II.3. Seqüência ilustrativa de produto de DDPCR após clonagem e sequenciamento. Primer arbitrário (5') e primer âncora com fragmento T7 (3') estão sublinhados.

Utilizando a metodologia descrita foi possível identificar um transcrito com similaridade a Fosfatidil Inositídeo 3-kinase, a qual foi originalmente encontrada somente em embriões 4 células, mas cuja presença, em diferentes concentrações, foi posteriormente observada em oócitos e embriões com diferente potencial de desenvolvimento por método convencional de PCR e por PCR em tempo real (Capítulos III e IV), confirmando a eficiência do sistema na identificação de transcritos expressos diferencialmente a partir de mínimas quantidades de RNA inicial. A metodologia DDPCR que desenvolvemos, embora necessite de um scanner de fluorescência, oferece muitas vantagens tais como sensibilidade, reprodutibilidade, custos reduzidos e segurança.

CAPÍTULO III

IDENTIFICAÇÃO DE GENES EXPRESSOS DIFERENCIALMENTE EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO COM ALTO E BAIXO POTENCIAL DE DESENVOLVIMENTO A BLASTOCISTO

Resumo

Apesar da grande melhora nos resultados da produção *in vitro* de embriões bovinos, o desenvolvimento de cerca de 60 a 70% dos oócitos fecundados é interrompido na fase de pré-implantação, fenômeno conhecido por bloqueio embrionário, o qual está associado com o processo de ativação do genoma embrionário (AGE), no estágio de 8 células. Sabe-se que embriões que atingem mais rapidamente o estágio de 8 células têm maior potencial de desenvolvimento a blastocisto que embriões mais lentos. Com base nesta evidência, utilizou-se a técnica de DDPCR para identificar genes transcritos no início do desenvolvimento em embriões produzidos *in vitro* com maior e menor potencial para atingir o estágio de blastocisto: embriões de desenvolvimento rápido (R8), com 8 células às 48 horas pós-inseminação (hpi), embriões de desenvolvimento lento (L8) com 8 células às 90 hpi e embriões lentos com 4 células às 48 hpi. Foram isolados 176 fragmentos expressos diferencialmente distribuídos da seguinte maneira: 42% presentes somente em embriões R8, 28,2% somente em embriões L8 e 10,3% somente em L4, além de 10,9% presentes em embriões R8 e L4 e ausentes em L8, e 6,9% e 1,7% apenas ausentes em R8 e L4, respectivamente. O sequenciamento de 27 fragmentos isolados revelou 30 genes expressos diferencialmente sendo, 18 seqüências apenas em embriões R8, 4 em L4 e 5 em L8. Os resultados obtidos demonstram que um grande número de transcritos está sendo expresso no momento da ativação do genoma embrionário e sugerem que podem ocorrer ativações do genoma embrionário com dois objetivos distintos: embriões R8 apresentam transcrição de genes necessários para a continuação do desenvolvimento embrionário e, embriões L4 e L8 ativam genes associados aos processos de morte celular por apoptose.

Palavras-chave: Embriões bovinos, *Differential Display* PCR, Ativação do genoma embrionário, Bloqueio do desenvolvimento.

1. Introdução e Revisão de Literatura

Em várias espécies, o transcriptoma embrionário do período de pré-implantação tem sido amplamente estudado visando compreender os mecanismos biológicos básicos que regem essa fase do desenvolvimento (TELFORD et al., 1990; SCHULTZ, 2002; TESFAYE et al., 2003; KAŇKA et al., 2003). Neste período, eventos fisiológicos e morfológicos, como a formação do zigoto, a ativação do genoma embrionário e a diferenciação celular na formação do blastocisto, são influenciados por diversos fatores relacionados ao sistema de cultivo *in vitro* (ZIMMERMANN e SCHULTZ, 1994).

Durante o processo de produção *in vitro* de embriões bovinos, cerca de 90% dos oócitos são capazes de atingir a maturação nuclear (progredindo de prófase I a metáfase II) e aproximadamente 80% dos que são fertilizados concluem pelo menos o segundo ciclo celular (GORDON, 1994). Do total de oócitos fertilizados, apenas 30 a 40% dão origem a embriões que eventualmente alcançam o estágio de blastocisto (LONERGAN et al., 2003), sendo que o restante sofre algum tipo de bloqueio que leva a interrupção do desenvolvimento.

Em geral, o potencial de desenvolvimento embrionário está associado à presença de RNAs mensageiros e proteínas, acumulados pelo oócito durante a oogênese, cuja principal função é manter o embrião durante os primeiros ciclos celulares até o momento da ativação do seu próprio genoma (SCHULTZ, 1993; DE SOUSA et al., 1998a e 1998b). Além disto, embora ainda não tenham sido esclarecidos os fatores que controlam a cinética da clivagem nesta fase do desenvolvimento, vários trabalhos associam a cinética do desenvolvimento pré-implantação com a competência embrionária (GRISART et al., 1994; HOLM et al., 1998; WARNER et al., 1998; LONERGAN et al., 1999; DYNNESES et al., 1999; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001; MEIRELLES et al., 2003; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2004). Sabe-se que embriões que clivam mais rapidamente após a fertilização têm maior potencial de desenvolvimento a blastocisto comparado àqueles que clivam mais lentamente (LONERGAN et al., 1999; DYNNESES et al., 1999).

O momento da ativação do genoma embrionário é variável de acordo com a espécie (DE SOUSA et al., 1998). Em bovinos, embora baixa quantidade de

transcritos possa ser detectada nos primeiros ciclos celulares, o momento da AGE ocorre predominantemente no estágio de 8 a 16 células (MEMILI e FIRST, 2000).

O bloqueio do desenvolvimento, que nos bovinos coincide com o momento da AGE, tem sido consensualmente considerado um mecanismo passivo de incompetência transcricional causado pela exaustão das reservas de mRNA e proteínas de origem materna. Entretanto, existem evidências de que esta hipótese não seja verdadeira uma vez que os oócitos carregam informações capazes de ativar mecanismos de morte celular programada (WARNER et al., 1998).

1.1. Hipótese

No momento da ativação do genoma embrionário, os embriões com alto potencial de desenvolvimento, ativam genes responsáveis pela sobrevivência embrionária ou, os embriões com baixo potencial de desenvolvimento, ativam genes capazes de desencadear os processos de morte celular.

1.2. Objetivo

Utilizando a técnica de *Differential Display* PCR (DDPCR), com as devidas modificações descritas no capítulo II, em embriões produzidos e classificados com base na cinética de desenvolvimento, nosso objetivo foi identificar genes transcritos diferencialmente entre os embriões bovinos com alto ou baixo potencial para atingir o estágio de blastocisto.

2. Material e Métodos

2.1. Produção *in vitro* de embriões bovinos

Oócitos foram obtidos de folículos medindo entre 2 a 8 mm de ovários de vacas zebus ou azebuadas oriundos de abatedouro localizado na cidade de Piracicaba - SP. Somente os oócitos classificados como grau 1 de acordo com Leibfried e First (1979) com células do *cumulus* compactas, completas, citoplasma límpido e de aspecto homogêneo (finas granulações) foram utilizados nos experimentos. Após a seleção, os oócitos foram lavados em meio TCM199 Hepes (Invitrogen™) suplementado com 10 % de SFB (Sigma) e piruvato (22μg/ml).

2.1.1. Maturação *in vitro* (MIV)

Os oócitos foram maturados em meio TCM199 com sais de Earles (Invitrogen™), glutamina e NaHCO₃ (Sigma) suplementado com 10 % de SFB, piruvato (22μg/ml), gentamicina (50μg/ml), 0,5 μg de FSH/ml, 50μg de LH/ml e 1μg de estradiol/ml em microgotas de 90μl de meio de maturação, cobertas com óleo mineral e levados à incubadora a 38,5°C, 5% CO₂ em ar e com máxima umidade, durante 20 a 22 horas.

2.1.2. Fertilização *in vitro* (FIV)

Após o período de maturação, os oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro*, em microgotas de 90μl de meio TALP suplementado com heparina (10μg/ml), piruvato (22μg/ml), gentamicina (50μg/ml), BSA sem ácidos graxos (6mg/ml) e solução de PHE (2μM de penicilamina, 1μM de hipotaurina e 0,25μM de epinefrina). As palhetas de sêmen de touro da raça Nelore passaram por processo de descongelamento em banho-maria a 35°C, durante 30 segundos e seu conteúdo foi centrifugado em gradiente de Percoll (45% sobre 90%) para

obtenção dos espermatozóides móveis, além da remoção do diluidor e do plasma seminal. O sobrenadante foi descartado e os espermatozóides diluídos a uma concentração de 2×10^6 células/mL e, após 30 minutos de incubação dos espermatozóides, os oócitos foram transferidos para as microgotas (30 oócitos/gota) cobertas com óleo mineral, onde permaneceram sob incubação em atmosfera com 5% de CO₂ em ar a 38,5°C durante 10 horas.

2.1.3. Cultivo *in vitro* (CIV) e separação dos grupos experimentais

Após os processos de MIV e FIV, os zigotos foram co-cultivados *in vitro* em meio CR2 modificado, suplementado com 10% de SFB com células da granulosa (WATANABE et al., 1999). Decorridas 48 horas pós-inseminação (hpi), a taxa de clivagem foi avaliada e os embriões que atingiram o estágio de 8 células, denominados de grupo Rápido (R8) e 4 células, grupo lento (L4), foram separados, congelados em N₂ líquido e estocados a -80°C para posterior extração de RNA. Para os demais embriões que apresentaram entre 2 e 3 blastômeros, realizou-se a renovação de 50% do meio de cultivo (*feeding*) e às 90 hpi, aqueles que atingiram o estágio de 8 células, denominados grupo Lento (L8), foram submetidos ao mesmo procedimento de seleção e congelamento (Figura III.1).

FIGURA III.1. Microscopia dos grupos experimentais de embriões bovinos produzidos *in vitro*. (A) Imagem característica de um embrião 8 células dos grupos R8 e L8 (48 e 90 hpi, respectivamente); (B) Imagem característica de um embrião 4 células do grupo L4 (48 hpi).

2.2. Técnica de *Differential Display* PCR Fluorescente

A figura III.2 apresenta um diagrama simplificado do desenho experimental utilizado. Os procedimentos de DDPCR empregados foram detalhados no Capítulo II. Em resumo, o RNA foi extraído de grupos de 50 embriões congelados de cada categoria (R8, L4 e L8). O cDNA produzido com o auxílio de cada primer âncora foi amplificado com 20 primers arbitrários (decâmeros) e primer T7 marcado (Tabela II.1; Capítulo II) e separados em gel de poliacrilamida desnaturante 6.5% em TBE 1X por 5 horas a 1,500V após pré-corrida por 30 min a 1,500V. Após eletroforese, os fragmentos amplificados foram visualizados com scanner a laser e os expressos diferencialmente após avaliação visual foram selecionados, isolados do gel de poliacrilamida com o auxílio de um bisturi, diluídos em água ultrapura e re-amplificados com o primer T7 não-marcado e o primer arbitrário correspondente. Os fragmentos re-amplificados foram clonados em vetor TOPO TA (InvitrogenTM) e seqüenciados com o kit BigDye dideoxi terminator (Applied Biosystems). As seqüências foram submetidas ao BLAST para identificação no GenBank.

FIGURA III.2. Desenho esquemático do experimento: os embriões foram produzidos *in vitro* e separados segundo a sua velocidade de desenvolvimento até o 3º ou 4º ciclo celular. Três grupos foram formados pelos embriões de desenvolvimento Rápido (R8) e Lento (L4 e L8) e submetidos a DDPCR para identificar genes envolvidos no bloqueio embrionário. Os cDNA de transcritos presentes ou ausentes em pelo menos um dos grupos foram clonados, seqüenciados e comparados com outras seqüências do NCBI com o programa Blast.

2.3. Confirmação da expressão diferencial

O mRNA foi extraído a partir de um *pool* de 50 embriões R8, L4 e L8, com o auxílio do kit QuickPrep Micro mRNA Purification (Amersham), e amplificado pelo kit MessageAmp aRNA (Ambion®), seguindo as instruções dos fabricantes. Resumidamente, o procedimento de amplificação consistiu na transcrição–reversa e síntese do cDNA dupla-fita utilizando um primer oligo(dT)T7 e transcrição *in vitro* com T7 polimerase. O RNA antisense amplificado (aRNA) foi novamente convertido em cDNA fita-dupla utilizando um primer específico, purificado e transcrito com T7 polimerase.

Nove microlitros do aRNA produzido anteriormente de cada grupo de embriões foi transcrito reversamente em reações de 20 µl contendo: 1 µl de *SuperScript* III (Invitrogen™) (200U/µl), 1µl de primer poli(A) (5 µM), 2 µl de dNTPs (2,5 mM cada), 2 µl de DTT (0,1 M), 1 µl de RNaseOUT® (40 U/µl; Invitrogen™) e 4 µl de tampão 5X. As reações foram realizadas a 42°C por 15 min, 50°C por 50 min e 70° por 15 min para inativação da enzima.

2.3.1. Caracterização do Perfil de Expressão dos Genes Isolados por PCR em tempo real

As análises de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o sistema de detecção ABI Prism® 7500 e tecnologia TaqMan® (Applied Biosystems). O desenho e a construção dos primers e sondas para os genes ITM2B, PI3K e controle endógeno (rRNA 18S), foram realizados pelo serviço *Assay-by-Design* (Applied Biosystems). Todas as reações foram preparadas utilizando TaqMan® PCR Universal Master Mix (Applied Biosystems), em 25 µl de volume total e temperatura de anelamento de 60°C, de acordo com as instruções do fabricante.

2.4. Análise dos dados

Diferenças na expressão dos genes, entre os grupos de embriões, foram avaliadas mediante a estimativa da eficiência de amplificação e a variação na taxa de expressão dos genes foi normalizada pela frequência de expressão do controle

endógeno (rRNA 18S). As diferenças de expressão dos genes foram apresentadas em relação ao grupo calibrador R8.

2.4.1. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a metodologia dos quadrados mínimos, através do procedimento GLM do sistema SAS (*Statistical Analysis System*, 9.1.3 version; SAS, 2003), que considera a estrutura de delineamento inteiramente casualizado para cada gene nos grupos relativos ao desenvolvimento embrionário. Previamente, um modelo considerando o efeito conjunto dos dois genes foi estudado, incluindo-se a possível interação entre estes. Porém tal interação não foi significativa ($p > 0,05$), desta forma, optou-se por estudar os genes separadamente. As médias foram comparadas utilizando-se o teste t de Student.

3. Resultados e Discussão

Neste capítulo, apresentamos os resultados obtidos por *Differential Display* PCR, conforme descrito no capítulo II, em grupos de embriões bovinos com alto e baixo potencial de desenvolvimento a blastocisto, classificados com base na cinética de desenvolvimento: embriões rápidos apresentando 8 células com 48 hpi (R8), embriões lentos com 4 células 48 hpi (L4) e 8 células 90 hpi (L8).

Partindo de quantidades mínimas de RNA total (~10 pg) a qualidade dos resultados comprova a eficiência do sistema desenvolvido e implementado na identificação de transcritos expressos diferencialmente. Experimentos de DDPCR semelhantes ao proposto rendem, aproximadamente, 100 fragmentos com amplificação diferenciada entre dois grupos de amostras (GLADNEY et al., 2004; BERTANI et al. 2004). Em média, uma combinação de primer âncora e arbitrário apresentou 180 fragmentos entre os três grupos, de tamanhos variando entre 1500 a 150 pb. Utilizando 60 combinações de primers, sendo 3 âncoras e 20 arbitrários, foi possível identificar e recuperar 176 fragmentos oriundos da amplificação diferencial do mRNA. Deste total, 42% foram isolados do grupo de embriões de desenvolvimento rápido R8, 28,2% e 10,3% dos embriões de desenvolvimento lento L8 e L4, respectivamente (Figura III.3).

A alta porcentagem de fragmentos oriundos do grupo R8 sugere que, no momento da ativação do genoma embrionário bovino, genes responsáveis pelo desenvolvimento, ou seja, pela sobrevivência embrionária, podem estar sendo ativados. Nos embriões L8, segundo grupo cujo número de fragmentos diferenciais é expressivo, há indícios da ativação do genoma cuja transcrição está associada a genes ligados ao bloqueio do desenvolvimento, concordando com a hipótese descrita neste capítulo e diferindo das teorias atuais de que embriões que sofrem bloqueio são transcricionalmente incompetentes (SIRARD et al., 2005).

FIGURA III.3. Porcentagem de fragmentos isolados pela técnica de *Differential Display* PCR de embriões de desenvolvimento rápido (R8) e lento (L4 e L8). Fragmentos ausentes em pelo menos um dos grupos também foram isolados.

A expressão diferencial de genes pró e anti-apoptóticos foi verificada em oócitos e embriões (JURISICOVA et al., 1998; DALBIÉS-TRAN e MERMILLOD, 2003). Este fato permite sugerir que, no momento da AGE, embriões de desenvolvimento rápido podem estar transcrevendo genes ligados ao desenvolvimento embrionário, diferente dos embriões de desenvolvimento lento, que podem estar transcrevendo genes associados à morte celular (MEIRELLES et al., 2003; 2004).

Embora acredita-se que a ativação do genoma embrionário bovino ocorra apenas entre os estágios de 8 a 16 células (DE SOUSA et al., 1998), alguns autores descrevem um baixo nível de transcrição em embriões bovinos de 1 a 4 células (MEMILI et al., 1998). Neste trabalho podemos observar que embriões do grupo L4 apresentam um menor número de transcritos expressos diferencialmente em relação aos embriões R8 e L8, embora não tenham sido feitas comparações com embriões de menor número de células neste mesmo

período. Esta característica pode confirmar a evidência de genes transcritos em momentos anteriores a AGE, como citado anteriormente (MEMILI et al., 1998) ou, ainda, degradação de transcritos herdados maternalmente.

Dos 27 fragmentos clonados e seqüenciados, 30 seqüências demonstraram similaridade a seqüências já descritas e depositadas no GenBank, como mostrado na tabela III.1. Muitas das seqüências identificadas encontram-se associadas à fisiologia embrionária bovina e podem auxiliar no entendimento dos processos biológicos envolvidos no desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

TABELA III.1. Descrição dos fragmentos isolados pelo sistema de *Differential Display* PCR, clonados e submetidos ao sequenciamento.

	ID seqüência	Nº de acesso	Identidade	Descrição	Embriões		
					R8	L4	L8
1	PI3KCA	NM_174574.1	118/142 (83%)	<i>Bos taurus</i> fosfoinositídeo-3-kinase, subunidade catalítica alfa, mRNA		✓	
2	OPTN	AF513722.1	410/455 (90%)	<i>Sus scrofa</i> optineurina, mRNA	✓		
3	FL405	AY308069.1	74/75 (98%)	<i>Bos taurus</i> NADH Desidrogenase (FL405 mitochondrion), genoma parcial	✓		
4	GCP372	XM_612144.1	418/432 (96%)	<i>Bos taurus</i> similar a Golgi autoantígeno, subfamília golgin B, mRNA	✓		
5	ITM2B	XM_587730.1	639/641 (99%)	<i>Bos taurus</i> similar à proteína integral de membrana 2B, mRNA parcial	✓		✓
6	TZP	AY706384.1	514/547 (93%)	<i>Sus scrofa</i> Fator de transcrição TZP, mRNA	✓		
7	COP2- γ	XM_591934.1	403/403 (100%)	<i>Bos taurus</i> similar a Coatomero subunidade gama-2, mRNA	✓	✓	
8	PISRT1	AF404302.1	145/174 (83%)	<i>Capra hircus</i> mRNA Gonadal sexo-específica			✓
9	RPL10A	BT020974.1	419/422 (99%)	<i>Bos taurus</i> Proteína ribossomal L10a, mRNA	✓		✓
10	-	XM_534132.1	104/120 (86%)	<i>Canis familiaris</i> similar a Interação epitelial estromal 1, mRNA		✓	
11	-	XM_581028.1	449/449 (100%)	<i>Bos taurus</i> similar a ciclina I, mRNA parcial		✓	
12	-	BC027322.1	133/141 (94%)	<i>Homo sapiens</i> Proteína mitocondrial da família das carreadoras, mRNA		✓	
13	*JPX/XIST	AJ421481.1	567/591 (95%)	<i>Bos taurus</i> Centro da região de inativação do cromossomo X, genes Jpx e Xist			✓
14	*	XM_588245.1	579/582 (99%)	<i>Bos taurus</i> similar a proteína hipotética desconhecida, mRNA			✓
15	*TRK	XM_581417.1	232/233 (99%)	<i>Bos taurus</i> similar Proteína "TRK-fused", mRNA			✓
16	EF1A	AF013213.1	514/520 (98%)	<i>Bos taurus</i> Fator de elongação 1 alfa, mRNA	✓		
17	SINEBov-2	X64125.1	298/350 (85%)	<i>Bos taurus</i> DNA para seqüência SINE Bov-2	✓		
18	PRDX	AF305561.1	134/134 (100%)	<i>Bos taurus</i> Peroxiredoxina 1, mRNA	✓		
19	STAT5A	AJ237937.1	74/74 (100%)	<i>Bos taurus</i> Gene parcial STAT5A, exons 5-19	✓		

Continua

continuação

	ID seqüência	Nº de acesso	Identidade	Descrição	Embriões		
					R8	L4	L8
20	-	AY644518.1	107/127 (84%)	<i>Bos taurus</i> gene do receptor de célula T, seqüência parcial			✓
21	SBBI22	BC014442.1	311/346 (89%)	<i>Homo sapiens</i> Fator hipotético nuclear SBBI22, mRNA	✓		
22	*	XM_592025	74/76 (97%)	<i>Bos taurus</i> similar a oligonucleotideo/oligosacarideo-binding fold containing 1	✓		
23	*	XM_585585	308/317 (97%)	<i>Bos taurus</i> similar a <i>ATP-binding cassette</i> , sub-família C, sequencia parcial.	✓		
24		XM_585174	450/451 (99%)	<i>Bos taurus</i> similar ao domínio da proteína Ankirina 17 isoforma a, mRNA.	✓	✓	
25	*	XM_868271	88/88 (100%)	<i>Bos taurus</i> similar a Papalisina 2 isoforma 1, seqüência parcial mRNA.	✓		
26	*	AY126697	542/547 (99%)	<i>Bos taurus</i> breed Nellore mitochondrion, genoma completo.	✓		
27		XM_873254	226/226 (100%)	<i>Bos taurus</i> <i>ATP binding protein</i> , transcrito variante 4, mRNA.	✓		
28	Napor-3*	AF090697	500/521 (95%)	<i>Mus musculus</i> Proteína ligante, relacionada a apoptose (Napor-3) mRNA.	✓		
29	NOD9	XM_872046	113/133 (84%)	<i>Bos taurus</i> similar Proteína NOD9 isoforma 1, transcrito variante 2, mRNA.	✓		
30	HIN1L	NG_005318	193/220 (87%)	<i>Homo sapiens</i> HIN1-like cysteine protease (HIN1L) pseudogene.	✓		

*Seqüências obtidas a partir de diferentes clones do mesmo fragmento isolado do gel de poliácridamida.

Isolada inicialmente do grupo de embriões L4, a Fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K; Tabela III.1) é responsável por regular vários processos biológicos que vão desde o crescimento, sobrevivência e proliferação até o metabolismo celular (FRUMAN, 1998; CRADDOCK et al., 1999; WYMAN et al., 2003). Esta molécula está relacionada à sinalização anti-apoptótica em um grande número de células (CRADDOCK et al., 1999) e, devido os achados relacionados ao nosso modelo de estudo, provavelmente está também associada à ativação e bloqueio de desenvolvimento embrionário.

Estudos de quantificação da expressão da PI3K foram realizados visando confirmar e estimar a variação na expressão dos genes entre os grupos de embriões citados. Os valores médios de Ct foram utilizados para os cálculos das estimativas da eficiência de amplificação para ambos os genes, dados pela equação $E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta})-1}$.

As Figuras III.4 e III.5 apresentam as curvas de amplificação e a expressão relativa média da PI3K nos diferentes grupos de embriões. Utilizando o grupo R8 como grupo calibrador, verifica-se que a expressão da PI3K nos embriões L4 e L8 é 4,7 e 8,7 vezes maior que R8, respectivamente. Como não foram verificadas diferenças de expressão significativas ($p < 0,05$) entre os grupos L4 e L8, os dados foram analisados em função da cinética do desenvolvimento. Foram constatadas diferenças significativas entre os embriões rápidos e lentos ($p < 0,01$). Estes resultados, além de confirmarem a eficiência da técnica de *Differential Display* PCR na identificação de genes expressos diferencialmente, demonstram o importante papel de sinalização anti-apoptótica da PI3K nos embriões lentos na tentativa de resgatar este grupo do bloqueio do desenvolvimento.

FIGURA III.4. Curvas de amplificação da quantificação relativa, por PCR em tempo real da PI3K (rosa) e do controle endógeno rRNA18S (azul), nos embriões bovinos com desenvolvimento Rápido (R8) e Lento (L4 e L8).

FIGURA III.5. Diferença na expressão relativa média da PI3K nos embriões bovinos com desenvolvimento Rápido (R8) e Lento (L4 e L8), quantificado por PCR em tempo real. No detalhe, está representada a expressão relativa média da PI3K em função da cinética de desenvolvimento para embriões rápidos (R) e lentos (L). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Outro transcrito que tem sua expressão relacionada a este modelo de estudo é o da Proteína Integral de Membrana 2B (ITM2B), membro de uma família de proteínas integrais de membrana tipo II, da qual também pertencem as ITM2A e ITM2C (VAN DEN PLAS e MERREGAERT, 2004; DELEERSNIJDER et al., 1996; CHOI et al., 2001). Esta molécula é descrita como um regulador pró-apoptótico por compartilhar o domínio BH3 presente nos membros da família Bcl-2 (FLEISCHER et al., 2002a).

A ITM2B induz ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial promovendo a liberação de citocromo c e conseqüentemente a ativação da caspase-9 e caspase-3 durante o processo de apoptose. É relatado que a super expressão de Bcl-2 age bloqueando a ação de ITM2B (FLEISCHER et al., 2002b).

Fleischer et al. (2002a) sugerem a participação da ITM2B na formação do Complexo PTP mitocondrial (*Permeability Transition Pore*) por se tratar de uma proteína integral de membrana e, assim como os outros membros da família Bcl-2, a ITM2B também está envolvida na formação de canais na membrana. Em ambos os casos o resultado é a perda do potencial de membrana mitocondrial caminhando para a morte celular programada.

A maior freqüência de mRNAs da ITM2B nos grupos de embriões 8 células de desenvolvimento lento, e a menor freqüência nos embriões de 8 células de desenvolvimento rápido e 4 células de desenvolvimento lento, é um indicativo de que no início da transcrição do genoma bovino a molécula ITM2B pode estar interagindo com o Bcl-2, em uma associação pelo domínio BH3 compartilhado por ambos. O mecanismo sugerido é a ITM2B agindo como uma molécula pró-apoptótica. Dessa forma induzindo a morte celular.

Dados obtidos em nosso laboratório, utilizando as metodologias de Cometa e TUNEL, mostraram que blastocistos gerados a partir dos embriões lentos (8 células às 90 hpi) apresentaram maior dano de DNA e fragmentação nuclear indicando a ocorrência de apoptose. Os primeiros eventos de fragmentação nuclear foram encontrados em embriões 8 células após período de 90 hpi (GARCIA, 2004).

Embora a ITM2B tenha sido inicialmente encontrada nos embriões 8 células rápidos e lentos pela DDPCR, os dados de expressão relativa mostraram que da

ITM2B está sendo aproximadamente 40 vezes mais expressa nos embriões de desenvolvimento lento (L8), conforme hipótese deste trabalho (Figuras III.6 e III.7; Tabela III.2). A presença em maior concentração deste transcrito no estágio de 8 células em embriões de desenvolvimento lento pode ser um indicativo de ativação do genoma embrionário para permitir que os embriões com menor competência entrem em processo de morte celular programada.

O envolvimento do Bcl-2 e ITM2B sob privação de Interleucina-2, pode levar ao desencadeamento do processo de morte celular programada em células T, conforme apresentado na figura III.9 (FLEISCHER et al., 2002). Neste mesmo esquema está representado o papel da PI3K na fosforilação de BAD conduzindo a sobrevivência celular ou apoptose.

FIGURA III.6. Curvas de amplificação da quantificação relativa, por PCR em tempo real, da ITM2B (azul) e do controle endógeno rRNA18S (preto), nos embriões bovinos com desenvolvimento Rápido (R8) e Lento (L4 e L8).

FIGURA III.7. Diferença na expressão relativa média da ITM2B nos embriões bovinos com desenvolvimento Rápido (R8) e Lento (L4 e L8), quantificado por PCR em tempo real. No detalhe, está representada a expressão relativa média da ITM2B em função do tempo de cultivo. Embriões rápidos (R8) e lentos (L4) apresentam 48hpi de cultivo e embriões lentos (L8) 90hpi. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

TABELA III.2. Eficiência de amplificação dos genes identificados por *Differential Display* PCR, Controle Endógeno (CE) e expressão relativa média em embriões bovinos de desenvolvimento rápido e lento.

Genes de interesse e Controle Endógeno	Eficiência da Reação	Expressão relativa média		
		R8	L4	L8
PI3K	0,97	1,00	4,7	8,7
ITM2B	0,99	1,00	1,35	40,44
rRNA18S	0,99	-	-	-

TABELA III.3. Resumo das principais funções de outros genes identificados por *Differential Display* PCR em embriões bovinos de desenvolvimento rápido e lento.

Gene de interesse	Função descrita na literatura associada ao desenvolvimento embrionário bovino	Referência
Fator de Elongação alfa 1	Cofator da síntese protéica em células eucarióticas, responsável pela ligação do RNAt aos ribossomos durante a elongação de peptídeos.	Knudsen et al. (1993); Kojima et al. (2002)
Ciclina I	Os primeiros relatos da Ciclina I datam de 1995, em que foi descrita em humanos cuja sua expressão não está relacionada ao ciclo celular.	Nakamura et al. (1995); Jensen et al. (2000)
Golgi autoantígeno	Transporte vesicular, manutenção da integridade estrutural do complexo de Golgi. As proteínas Golgi podem ser alvo de respostas auto-imunes. Possível envolvimento na regulação de processos apoptóticos via caspase-12	Nozawa et al. (2002); Mancini et al. (2000)
STAT5A	Fator de transcrição citoplasmático, Identificada em embriões R8 reforça sua função anti-apoptótica e possível envolvimento com a PI3K.	Seyfert et al. (2000); Buitenhuis et al. (2004); Debierre-Grockiego (2004)
Peroxiredoxina 1 (PRDX1)	Pertencente à família das peroxidases, está envolvida na proteção antioxidante e sinalização celular. PRDXs são expressa durante a maturação e o desenvolvimento embrionário em bovinos	Leyens et al. (2004); Leyens et al. (2003)
X Inactive-specific transcript (XIST)	XIST é um gene <i>imprinted</i> responsável pela inativação do cromossomo X durante o desenvolvimento embrionário da fêmea.	De La Fuente et al. (1999) Wrenzycki et al. (2002); Ruddock et al. (2004);
Napor	Napor é uma proteína-ligante de RNA (ELAV, <i>embryonic lethal abnormal vision</i>), identificada como indutor de apoptose em células neuronais. Uma das funções está relacionada ao controle da tradução e estabilidade do mRNA.	Pacini et al. (2005); Choi et al. (2003)

CAPÍTULO IV

PI3K NO DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO

Resumo

Visando identificar a presença e quantificar a expressão dos transcritos da PI3K em embriões bovinos com diferentes potenciais de desenvolvimento a blastocisto, e também em oócitos de diferentes qualidades morfológicas, foram desenvolvidos testes com base nas técnicas de PCR qualitativo e PCR Tempo Real. Foi confirmada a presença do transcrito da PI3K em todas as amostras biológicas analisadas pela amplificação de parte do cDNA das isoformas de 453pb e 290pb, além do heterodímero destas isoformas. Pôde-se observar que com a diminuição da qualidade do oócito e nos embriões L4 e L8 a proporção entre os diferentes fragmentos amplificados é alterada, levando a um aumento da frequência relativa do fragmento de 453pb nos oócitos desnudos. A PI3K, responsável por vários processos biológicos, age como mediador na maturação do oócito e também em processos associados à sinalização anti-apoptótica. A hipótese deste trabalho é que expressão da PI3K em oócitos e embriões está associada com mecanismo de proteção anti-apoptótico.

Palavras-chave: PI3K, oócitos, embriões bovinos, *Differential Display* PCR.

1. Introdução e Revisão de Literatura

As Fosfoinositídeo 3-Kinases (PI3Ks) são uma família de enzimas capazes de catalizar a fosforilação dos fosfoinositídeos e seus derivados na posição D3 do anel inositol (Fruman et al., 1998). Estas enzimas, compostas por duas subunidades, uma regulatória/adaptadora e outra catalítica, comumente denominadas de *p85* (isoformas α e β) e *p110* (isoformas α , β e δ), respectivamente, regulam vários processos biológicos desde a transformação a sobrevivência, proliferação e metabolismo celular (Figura IV.1). Esta molécula também está relacionada à sinalização anti-apoptótica em um grande número de células (CRADDOCK et al., 1999; FRUMAN, 1998).

Existem múltiplas isoformas de PI3K divididas em três classes (WYMAN e PIROLA, 1998; VANHAESEBROECK, *et al.*, 1997; FRUMAN *et al.*, 1998). Todas as subunidades catalíticas das PI3Ks compartilham uma região de homologia que consiste num domínio catalítico, ligado ao chamado domínio de homologia da fosfoinositídeo quinase (PIK, de PI kinase homology), cuja função é desconhecida.

Relacionadas a PI3K encontram-se várias outras moléculas, entre as quais a proteína quinase B (PKB ou Akt), que fosforila várias proteínas pró e anti-apoptóticas, incluindo membros da família Bcl-2 tais como BAD, Caspase-9 entre outros, promovendo a sobrevivência celular (DOWNWARD, 1998; Figura IV.1). A utilização de dois inibidores, LY294002 (VLAHOS et al., 1994) e Wortmannin (YANO et al., 1993), tem sido descrita em estudos de sinalização anti-apoptótica da PI3K e ativação de PKB (SCHEID e DURONIO, 1998; DATTA et al., 1997).

FIGURA IV.1. Sinalização da enzima PI3K. A figura ilustra as moléculas que ativadas pela PI3K fosforilada, desencadeiam uma série de processos importantes para a célula. O envolvimento da PI3K na sobrevivência, ciclo celular e transcrição são algumas das funções da molécula que, entre outras, despertam o interesse no desenvolvimento e bloqueio embrionário em bovinos e que podem ser estudados neste modelo (Figura adaptada de WYMAN et al., 2003)

Modificações pós-traducionais da subunidade p110 alfa e beta da PI3K, membros da Akt e PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10*) são responsáveis pela ativação da cascata de sinalização da PI3K (SCHEID e WOODGETT, 2001). A PTEN pode agir desfosforilando os fosfoinosítídeos bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) e trifosfato PtdIns(1,4,5)P₃) tornando-se um antagonista da

sinalização PI3K. Certos tipos celulares que apresentam a perda do gene PTEN exibem expressão constitutiva da PI3K e passam por apoptose em resposta a inibição genética ou farmacológica da PI3K (PAEZ e SELLERS, 2002). Além disso, Furnari et al. (1998) demonstraram que PTEN pode fosforilar PIP3, o principal produto do PI3K. Por outro lado, o PIP3 é necessário para a translocação da proteína quinase B (Akt1, PKB) para a membrana celular.

Estudos investigando o papel da PI3K em células germinativas e embrionárias têm sido relatados. Evidências do envolvimento da PI3K nos processos de maturação meiótica foram verificadas em complexos cumulus oócitos (COCs) em bovinos (ANAS et al., 1998) e suínos (SHIMADA et al., 2001) cultivados na presença ou ausência de inibidores da PI3K. Em suínos, a inibição da PI3K nas células do cumulus interferiu na progressão da meiose.

O papel da subunidade catalítica p110 alfa no desenvolvimento embrionário em camundongos também foi demonstrado. Embriões homozigotos cujo gene codificante da p110 alfa havia sido deletado, morreram a partir do dia 9.5 devido à perda de proliferação celular, embora não tenha sido observado aumento da frequência de apoptose. Em contrapartida, a subunidade regulatória p85 apresentou-se super expressa nestes embriões (BI et al. 1999). Bi et al., (2001) também mostraram, por meio da subtração do alelo que codifica a p110 da isoforma β , que o estado homozigoto leva à letalidade embrionária ainda na fase de pré-implantação.

Entre os resultados obtidos por meio da técnica de *Differential Display* PCR, descrita nos capítulos II e III, foi identificada a subunidade catalítica (p110 α) da PI3K em embriões de desenvolvimento lento 4 células (48 horas pós-inseminação). A expressão diferencial da PI3K entre os grupos de embriões estudados foi investigada e sugere uma associação com a ativação e com o bloqueio do genoma embrionário em bovinos.

1.1. Hipótese

A expressão diferencial da PI3K entre os grupos de embriões de desenvolvimento rápido e lento e sua relação com proteínas pró e anti-apoptóticas está associada à ativação e com o bloqueio do genoma embrionário em bovinos.

1.2. Objetivos

Este capítulo tem como objetivos identificar e quantificar transcritos da PI3K em embriões bovinos com diferentes potenciais de desenvolvimento a blastocisto diferenciado, bem como em oócitos de diferentes qualidades morfológicas.

2. Material e Métodos

2.1. Produção *in vitro* de embriões bovinos

Embriões bovinos foram produzidos *in vitro* após a maturação dos oócitos, fertilização e cultivo de acordo com o protocolo descrito no capítulo anterior. Resumidamente, três grupos diferentes foram utilizados: embriões 4 e 8 células, L4 e R8, respectivamente, às 48 horas pós-inseminação (hpi) e, embriões 8 células (L8) às 90 hpi. Os embriões foram retirados do cultivo, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C até o momento da extração do RNA.

2.2. Obtenção de oócitos bovinos

Grupos de 50 oócitos bovinos não maturados, obtidos de folículos medindo entre 2 a 8 mm, foram classificados de acordo com a qualidade morfológica dos COCs: qualidade A (*cumulus* completo e compacto), B (*cumulus* parcial e compacto), C (*cumulus* expandido) e D (ausência de *cumulus*). Foram utilizados apenas oócitos com ooplasma sem a presença de degeneração citoplasmática visível na avaliação morfológica, desnudados mecanicamente por pipetagem e quimicamente com Hialuronidase (1mg/ml), congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C até o momento da extração do RNA (Figura IV.2).

FIGURA IV.2. Classificação dos oócitos bovinos: (A) *cumulus* completo e compacto; (B) *cumulus* parcial e compacto; (C) *cumulus* expandido e (D) ausência de *cumulus*.

2.3. Extração do RNA e RT-PCR

O RNA foi extraído de grupos de 50 oócitos e embriões congelados de cada categoria (oócitos de qualidades A, B, C e D; embriões R8, L4 e L8) com o kit Rneasy (Qiagen, Germany) seguindo as instruções do fabricante e aproximadamente 10 pg do RNA total de cada grupo experimental foi transcrito reversamente em reações de 20 µl contendo 1 µl de *SuperScript* III (Invitrogen™) (200U/µl), 1µl de oligo DT (500 µg/ml), 2 µl de dNTPs (2,5 mM cada), 2 µl de DTT (0,1 M), 1 µl de RNaseOUT® (40 U/µl; Invitrogen™) e 4 µl de tampão 5X. As reações foram realizadas a 42°C por 15 min, 50°C por 50 min e 70° por 15 min para inativação da enzima.

2.4. Amplificação da PI3K em embriões e oócitos bovinos

As reações de amplificação foram realizadas em volume total de 20 µl contendo 1,33 µl de cDNA, 2 µl de tampão 10X da *Taq* polimerase, 4 µl de dNTPs (2,5 mM cada), 2,66 µl de primer senso 5' GTG TTG CCA CCT TCA TTT TG 3' (5 µM), 2,66 µl de primer anti-senso 5' CCA TTT TTG TTG TCC AGC CAC 3' (5 µM), 0,2 µl de *Taq* DNA polimerase (5 U/µl) e 1,2 µl de MgCl₂ (50 mM). As condições de termociclagem foram: 95°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 92°C por 15

segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, com extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídeo (1 mg/ml) e visualizados com scanner de fluorescência Fuji FLA3000 (Fuji Film) e pelos softwares Image Reader FLA-3000G Series versão 1.11 e Image Gauge versão 3.12 (Fuji Film).

2.5. Confirmação da expressão diferencial

O mRNA foi extraído a partir de um *pool* de 50 embriões R8, L4 e L8, com o auxílio do kit QuickPrep Micro mRNA Purification (Amersham), e amplificado pelo kit MessageAmp aRNA (Ambion), seguindo as instruções dos fabricantes. Resumidamente, o procedimento de amplificação consistiu na transcrição–reversa e síntese do cDNA dupla-fita utilizando um primer oligo(dT) promotor T7 seguido da transcrição *in vitro* com utilização da T7 DNA polimerase. O RNA amplificado (aRNA, antisenso) foi convertido em cDNA mediante aplicação de um primer oligo(dA) promotor T7 e utilizando em um segundo ciclo de amplificação com a enzima T7 DNA polimerase.

Aproximadamente 1 micrograma de aRNA produzido a partir de cada grupo de embriões foi transcrito reversamente em reações de 20 µl contendo: 1 µl de *SuperScript* III (Invitrogen™; 200U/µl), 1µl de primer poli(A) (5 µM), 2 µl de dNTPs (2,5 mM cada), 2 µl de DTT (0,1 M), 1 µl de RNaseOUT® (40 U/µl; Invitrogen™) e 4 µl de tampão 5X. As reações foram realizadas a 42°C por 15 min, 50°C por 50 min e 70° por 15 min para inativação da enzima.

2.6. Caracterização do Perfil de Expressão dos Genes Isolados por PCR em tempo real

As análises de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o sistema de detecção ABI Prism® 7500 e tecnologia TaqMan® (Applied Biosystems). O desenho e

a construção dos primers e sondas para o gene de interesse (PI3K) e controle endógeno (rRNA 18S), foram realizados pelo serviço *Assay-by-Design* (Applied Biosystems). Todas as reações foram preparadas utilizando TaqMan® PCR Universal Master Mix (Applied Biosystems), em 25 µl de volume total e temperatura de anelamento de 60°C, de acordo com as instruções do fabricante.

2.7. Análise dos dados

Diferenças na expressão dos genes entre os grupos de embriões foram avaliadas mediante a estimativa da eficiência de amplificação e a variação na taxa de expressão dos genes normalizada pela frequência de expressão do controle endógeno (rRNA 18S). As diferenças de expressão dos genes são apresentadas em relação ao grupo R8 (calibrador).

2.7.1. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a metodologia dos quadrados mínimos, através do procedimento GLM do sistema SAS (*Statistical Analysis System*, 9.1.3 version; SAS, 2003) que considera a estrutura de delineamento inteiramente casualizado para o gene PI3K nos grupos relativos ao desenvolvimento embrionário. As médias foram comparadas utilizando-se o teste t de Student.

3. Resultados e Discussão

Por meio da técnica de *Differential Display* PCR, descrita anteriormente no capítulo II e III, foi identificada uma seqüência expressa diferencialmente em embriões do grupo L4. Esta molécula apresenta similaridade com a subunidade catalítica da enzima Fosfatidilinositídeo 3-Kinase (PI3K) e devido ao grande interesse que ela pode representar no que diz respeito ao desenvolvimento embrionário em bovinos, estudos mais aprofundados foram realizados.

Duas isoformas da PI3K puderam ser identificadas, por PCR convencional, tanto em embriões quanto em oócitos, sendo uma de 453pb (subunidade p110 alfa) e outra de aproximadamente 290pb, além do heterodímero destas isoformas (Figura IV.3). Verificamos também que, independente da velocidade de desenvolvimento dos embriões, embriões rápidos ou lentos, e da morfologia dos oócitos, todos os grupos estudados apresentaram transcritos de PI3K nas suas possíveis isoformas.

Na análise da intensidade de fluorescência dos fragmentos amplificados para PI3K em oócitos (Figura IV.4), o pico indicado pela seta representa a subunidade catalítica *p110 alfa*. Nos embriões de desenvolvimento lento 4 e 8 células, ao contrário dos R8, a proporção da isoforma 453pb é maior em relação a isoforma 290pb, sugerindo uma degradação desta em função do tempo de cultivo (Figura IV.5). Nos oócitos desnudos foi verificado o mesmo perfil o que sugere um mecanismo de proteção do oócito na prevenção da apoptose.

FIGURA IV.3. Amplificação de parte da seqüência da PI3K em oócitos classificados de acordo com as células do *cumulus* (qualidades de oócitos de A–D) e em embriões bovinos R8, L4 e L8. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

FIGURA IV.4. Intensidade de fluorescência dos fragmentos amplificados da PI3K (453pb, 290pb e heterodímero) em oócitos classificados como: (A) *cumulus* completo e compacto; (B) *cumulus* parcial e compacto; (C) *cumulus* expandido e (D) ausência de *cumulus*. Todos os oócitos foram desnudados para a extração do RNA. Seta indica a subunidade catalítica *p110 alfa* de 453pb.

FIGURA IV.5. Intensidade de fluorescência dos fragmentos amplificados da PI3K (453pb, 290pb e heterodímero) em embriões bovinos de desenvolvimento rápido (R8) e lento (L4e L8). Seta indica a subunidade catalítica *p110 alfa* de 453pb.

Confirmada a presença do transcrito da PI3K em embriões e oócitos bovinos, foi realizado o experimento de quantificação da expressão relativa deste transcrito nos grupos de embriões L4 e L8 em relação ao grupo R8. Os resultados mostraram que, embora os transcritos da PI3K estejam presente em baixa frequência, o que demonstra a sensibilidade do sistema de *Differential Display* PCR, sua expressão foi 4,7 e 8,7 vezes maior que R8, conforme demonstrado na Figura IV.6 e discutido no capítulo III.

FIGURA IV.6. Diferença na expressão relativa média da PI3K nos embriões bovinos com desenvolvimento Rápido (R8) e Lento (L4 e L8), quantificado por PCR em tempo real. No detalhe, está representada a expressão relativa média da PI3K em função da cinética de desenvolvimento para embriões rápidos (R) e lentos (L). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Tem sido relatado o envolvimento da PI3K no processo de sobrevivência celular (Figura IV.6; Frank *et al.*, 1997) e que embriões de desenvolvimento lento têm uma maior probabilidade de bloqueio do desenvolvimento (De Sousa *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1995). Esses resultados sugerem que a maior presença de transcritos deste gene em embriões de desenvolvimento lento, 4 e 8 células, pode estar agindo na fosforilação da proteína pró-apoptótica BAD, via PI3K/AKT, no intuito de resgatar estes embriões mais propensos a bloqueio do desenvolvimento.

3.1. Modelo de sinalização da PI3K

FIGURA IV.7. Sinalização PI3K/Akt. PI3K ativada catalisa a conversão de Fosfoinosítídeo bifosfato (PtdIns-4,5-P₂) em Fosfoinosítídeo trifosfato (PtdIns-3,4,5-P₃). Estes lipídeos recrutam proteína Akt (PKB) e PDK1 para a membrana plasmática. Akt é, então, fosforilado e ativado por PDK, com isso PKB confirma seu papel como regulador de uma variedade de funções celulares, incluindo regulação do ciclo celular (Ciclina D1) e prevenção de apoptose (BAD). PTEN, antagonizador da sinalização PI3K, age defosforilando PtdIns-4,5-P₂ e PtdIns-3,4,5-P₃. No nosso modelo de estudo, o aumento da concentração da PI3K pode estar ligada ao bloqueio (Ciclina) e apoptose (BAD). Adaptado de Franke e Cantley (1997).

CAPÍTULO V

RESUMO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

1. Resumo dos Resultados

- Foi desenvolvido um protocolo alternativo para a técnica de DDPCR que permitiu amplificar e recuperar transcritos expressos diferencialmente a partir de amostras reduzidas de RNA total (de 10 a 25 pg de mRNA) oriundas de grupos de embriões bovinos com ou sem competência de desenvolvimento a blastocisto.
- Dos fragmentos isolados pelo sistema de DDPCR, a maioria faz parte dos grupos embriões 8 células rápidos e lentos, sugerindo que um grande número de transcritos está sendo expresso no momento da ativação do genoma embrionário bovino.
- Transcritos da PI3K foram identificados nos embriões e nos oócitos bovinos. Esta molécula é responsável por regular processos biológicos além de estar relacionada à sinalização anti-apoptótica em um grande número de células.
- A quantificação da expressão relativa da PI3K nos embriões bovinos com alto e baixo potencial de desenvolvimento a blastocisto mostrou que, embriões L4 e L8, apresentam, em média, 4,7 e 8,7 vezes mais PI3K em relação a embriões R8.
- Transcritos da ITM2B também foram identificados. Esta molécula, descrita como regulador pró-apoptótico, pode induzir a cascata de caspases durante o processo de morte celular.
- A quantificação da expressão relativa média da ITM2B indicou uma expressão aproximadamente 1,35 e 40,44 vezes maior nos embriões L4 e L8, respectivamente, em relação aos embriões R8.

2. Discussão Geral

Nesta tese, foram apresentados os resultados obtidos com a utilização da técnica de *Differential Display* PCR fluorescente, adaptada para quantidades mínimas de mRNA.

A partir de embriões de desenvolvimento rápido e lento, com alto e baixo potencial de desenvolvimento a blastocisto, foram amplificados e isolados diversos fragmentos expressos diferencialmente, dentre os quais puderam ser identificados genes que possuem importante relação com o desenvolvimento embrionário.

Dentre estes genes, foram escolhidos a PI3K e ITM2B por apresentarem funções anti e pró-apoptótica, respectivamente, que podem auxiliar na compreensão dos mecanismos que controlam o potencial de desenvolvimento em embriões bovinos. No modelo proposto nesta tese, três grupos de embriões foram avaliados e os resultados analisados em função do tempo de cultivo e cinética do desenvolvimento relacionados com o potencial de desenvolvimento a blastocisto.

Em embriões R8, a expressão relativa média da PI3K foi mais baixa e diferente de embriões L4 e L8 (Figura V.1), sugerindo uma ação da PI3K dependente da cinética das clivagens e da fase do ciclo celular, na tentativa de resgatar embriões mais propensos ao bloqueio do desenvolvimento. Em embriões lentos 4 células, que estão em fase anterior a principal ativação do genoma, genes relacionados ao potencial de desenvolvimento ou bloqueio podem ainda não ter sido ativados. Neste grupo de embriões juntamente com os embriões R8, a baixa expressão da ITM2B sugere um mecanismo tempo-dependente levando a maior presença de fatores ligados à sobrevivência embrionária.

FIGURA V.1. Comparação da expressão relativa média da PI3K e ITM2B nos grupos de desenvolvimento rápido (R8) e lentos (L4 e L8).

Os embriões dos grupos R8 e L8, que apresentam a maioria dos transcritos expressos diferencialmente, o tempo de cultivo pode ter favorecido uma maior expressão de genes relacionados ao alto potencial desenvolvimento nos embriões R8 e genes ligados à morte ou sobrevivência nos embriões L8. Nestes embriões lentos, entenda-se sobreviver como escapar ou resistir a uma determinada condição. A decisão de qual caminho o embrião vai seguir dependerá do balanço entre os fatores pró e anti-apoptóticos, semelhante à relação BAX/Bcl-2, além das interações com o meio e o tempo de cultivo.

Finalmente, a presença de transcritos de genes importantes cuja expressão diferencial está associada a mecanismos de sobrevivência e morte celular em embriões bovinos, sugere que duas diferentes ativações do genoma podem estar ocorrendo: o grupo de desenvolvimento rápido, que ativa genes ligados a sobrevivência embrionária e, o grupo lento que ativa os genes ligados à morte celular.

3. Modelo Biológico Hipotético

FIGURA V.2. Modelo biológico hipotético da ação da PI3K e da ITM2B em embriões com alto e baixo potencial de desenvolvimento a blastocisto. Embriões com alto potencial (R8) apresentam expressão equilibrada de PI3K e ITM2B. A ativação da PI3K neste grupo age na manutenção da vida embrionária ao longo do desenvolvimento. Embriões com baixo potencial (L8), apresentam alta expressão de ITM2B, promovendo a formação de dímeros de BAX e desencadeando a cascata de caspases no processo de apoptose. Embriões L4, embora tenha sido evidenciada uma maior expressão de PI3K em relação ao grupo R8, estes embriões podem estar sujeitos a bloqueio pela ação da PI3K ativando AKT que, por sua vez, não fosforila BAD ou, então, pela maior expressão da ITM2B, em processo semelhante a embriões L8.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

-
- A DDPCR fluorescente permitiu a amplificação e o reconhecimento de genes transcritos relacionados à fisiologia embrionária, demonstrando a sensibilidade da técnica desenvolvida.
 - Grande parte dos genes identificados pela DDPCR tem função relacionada à transcrição e a morte celular, o que sugere uma relação com o bloqueio ou ativação do genoma embrionário em bovinos.
 - Há uma grande quantidade de transcritos expressos diferencialmente em embriões de desenvolvimento lento. Este dado sugere a confirmação da hipótese de um processo de bloqueio do desenvolvimento embrionário ativo.
 - A PI3K foi mais expressa em embriões de desenvolvimento lento e pode estar agindo na fosforilação da proteína pró-apoptótica BAD, via PI3K/AKT, no intuito de resgatar este grupo de embriões mais propensos a bloqueio do desenvolvimento. No entanto, a expressão de uma isoforma de função não caracterizada da PI3K pode indicar outros mecanismos desconhecidos.
 - A maior expressão da ITM2B em embriões oito células de desenvolvimento lento pode ser um indicativo de ativação do genoma embrionário para permitir que os embriões com menor competência entrem em processo de morte celular programada.

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, London, n. 215, p.403-410, 1990.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, 25, p.3389-3402, 1997.

ANAS, M-K.I.; SHIMADA, M.; TERADA, T. Possible role for phosphatidylinositol 3-kinase in regulating meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, Stoneham, v. 50, p.347-356, 1998.

AO, A.; ERICKSON, R.P.; WINSTON, R.M.; HANDYSIDE, A.H. Transcription of paternal Y-linked genes in the human zygote as early as the pronucleate stage. **Zygote**, Cambridge, 2(4), p.281-7, 1994.

BACHVAROVA, R.F. A maternal tail of poly(A): the long and the short of it. **Cell**, Cambridge, 12; 69(6), p.895-7, 1992.

BARNES, F.L.; FIRST, N.L. Embryonic transcription in *in vitro* cultures bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, n. 29 (2), p.117-123, 1991.

BAUER, D., MÜLLER, H., REICH, J., RIEDEL, H., AHRENKIEL, V., WARTHOF, P. AND STRAUSS, M. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved differential display technique (DDRT-PCR). **Nucleic Acids Res.**, Oxford, n. 21, p.4272-4280, 1993.

BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biol. Reprod.**, Champaign, n. 28 (1), p.235-247, 1983.

BERTANI GR, GLADNEY CD, JOHNSON RK, POMP D. Evaluation of gene expression in pigs selected for enhanced reproduction using differential display PCR: II. Anterior pituitary. **J. Anim. Sci.**, Champaign, 82(1), p.32-40, 2004.

BI, L.; OKABE, I; BERNARD, D. J.; WYNshaw-BORIS, A.; NUSSBAUM, R.L. Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, 274 (16), p.10963-10968, 1999.

BRACKETT, B.G., BOUSQUET, D., BOICE, M.L., DONARVICK, W.J., EVANS, J.F., DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biol. Reprod.** Champaign, n. 27, p.147-158, 1982.

BOUSQUET, D., TWAGIRAMUNGU, H., MORIN, N., BRISSON, C., CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. In vitro embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryos production approach. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p.59-70, 1999.

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

BREVINI, T.A.L.; LONERGAN, P.; CILLO, F.; FRANCISCI, C.; FAVETTA, L.A; FAIR, T; GANDOLFI, F. Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, 63, p.510–517, 2002.

BUITENHUIS M, COFFER PJ, KOENDERMAN L. et al. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5). **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 36(11), p.2120-4, 2004.

CHO, Y-J., MEADE, J.D., WALDEN, J.C., CHEN, X. GUO Z. AND LIANG, P. Multicolor Fluorescent Differential Display. **BioTechniques**, Natick, 30, p.562-572, 2001.

CHOI, D.K.; YOO, K.W.; HONG, S.K.; RHEE, M.; SAKAKI, Y.; KIM, C.H. Isolation and expression of Napor/CUG-BP2 in embryo development. **Biochem Biophys Res Commun.**, Orlando, 6;305(3), p.448-54, 2003.

CRADDOCK, B.L.; ORCHISTON, E.A.; HINTON, H.J.; WELHAM, M.J. Dissociation of apoptosis from proliferation, protein kinase B activation, and BAD phosphorylation in interleukin-3-mediated phosphoinositide 3-kinase signaling. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, 274 (15), p. 10633-10640, 1999.

DALBIÉS-TRAN, R; MERMILLOD, P. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during in vitro maturation. **Biol Reprod.** Champaign, 68(1), p.252-61, 2003.

DATTA, S.R.; DUDEK, H.; TAO, X.; MASTERS, S.; FU, H.; GOTOH, Y. GREENBERG, M.E. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. **Cell**, Cambridge, 91, p.231-241, 1987.

DE LA FUENTE R, HAHNEL A, BASRUR PK, KING WA. X inactive-specific transcript (Xist) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. **Biol Reprod.** Champaign, 60(3), p.769-75, 1999.

DE SOUSA PA, CAVENEY A, WESTHUSIN ME, WATSON AJ. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. **Theriogenology**, Stoneham, n. 49(1), p.115-28,1998a.

DE SOUSA, P. A.; WESTHUSIN, M. E.; WATSON, A. J. Analysis of variation in relativemRNA abundance for specific gene transcripts in single bovine oocytes and early embryos. **Mol. Reprod. Develop.**, New York, 49, p.119-130, 1998b.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F. Anti-apoptotic role of STAT5 in haematopoietic cells and in the pathogenesis of malignancies. **Apoptosis**, 9(6), p.717-28, 2004.

DELEERSNIJDER W, HONG G, CORTVRINDT R, ET AL. Isolation of markers for chondro-osteogenic differentiation using cDNA library subtraction. Molecular cloning and characterization of a gene belonging to a novel multigene family of integral membrane proteins. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, 271(32), p.19475-82, 1996.

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**, Stoneham, n., v. 57, p. 57-20, 2002.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y.F.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, 11;93(12), p.6025-30, 1996.

DOMINKO, T.; FIRST, N L. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. **Mol Reprod Dev.**, New York, 47(4), p.456-67, 1997.

DOWNWARD, J. Ras signalling and apoptosis. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, London, 8(1), p.49-54, 1998.

DYNNES, A.; LONERGAN, P.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. YANG, X. Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. **Mol. Reprod. Dev.** New York, 53(3), p.318-324, 1999.

DOSS, R.P. Differential display without radioactivity – a modified procedure. **BioTechniques**, Natick, 21, p.408-412, 1996.

EL-HALAWANY; PONSUKSILI, S. WIMMERS, K.; GILLES, M.; TESFAYE, D. SCHELLANDER, K. Quantitative expression analysis of blastocyst-derived gene transcripts in preimplantation developmental stages of in vitro-produced bovine embryos using real-time polymerase chain reaction technology. **Reprod. Fert. Dev.**, Melbourne, 16, p.753-762, 2004.

EPPIG, J.J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **Bioessays**, Cambridge, 13(11), p.569-574, 1991.

FAIR, T; GUTIERREZ-ADAN A; MURPHY M; RIZOS D; MARTIN F; BOLAND M. P.; LONERGAN, P. Search for the bovine homolog of the murine ped gene and characterization of its messenger RNA expression during bovine preimplantation development. **Biol. Reprod.**, Champaign, 70(2), p.488-494, 2004.

FLEISCHER, A., AYLLON, V., DUMOUTIER, L., RENAULT, J.C., REBOLLO, A. Proapoptotic activity of ITM2Bs, a BH3-only protein induced upon IL-2-deprivation which interacts with Bcl-2. **Oncogene**, Basingstoke, 21, p.3181-3889, 2002.

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

FLEISCHER, A.; REBOLLO, A. Induction of p53-independent apoptosis by the BH3-only protein ITM2Bs. **FEBS Letters**, Amsterdam, 557, p.283-287, 2004.

FRANKE, T.F.; CANTLEY, L.C. Apoptosis. A Bad kinase makes good. **Nature**, London 13, p.390(6656), p.116-117, 1997.

FRUMAN, D. A.; MEYERS, R.E.; CANTLEY, L.C. 1998. Phosphoinositide Kinases. **Annu. Rev. Biochem.**, 67, p.481-507.

FURNARI, F.B.; LIN, H.; HUANG, H.S.; CAVENEE, W.K. Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. **Proc Natl Acad Sci**, Washington, 11; 94(23), p.12479-84, 1998.

GARCIA, S.M. Bloqueio e morte celular programada em embriões bovinos: efeitos da fonte de suplementação protéica e da cinética do desenvolvimento. **Dissertação de Mestrado**, FZAE/USP, 2004.

GLADNEY CD, BERTANI GR, JOHNSON RK, POMP D. Evaluation of gene expression in pigs selected for enhanced reproduction using differential display PCR and human microarrays: I. Ovarian follicles. **J. Anim. Sci.**, Champaign 82(1), p.17-31; 2004.

GOLDBARD, S. B., VERBANAC, K. M.; WARNER, C. M. Genetic analysis of H-2 Linked Gene(s) affecting early mouse embryo development. **J. Immunogenet.**, Oxford 9, p.77-82, 1982.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. 1ed. Cambridge: University Press, p.639, 1994.

GRISART, B.; MASSIP, A.; DESSY, F. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, 101(2), p.257-64, 1994.

GUTIÉRREZ-ADAN, A.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G. B.; MEDRANO, J. F.; MURRAY, J. D. Relationship between stage of development and sex of bovine IVM-IVF embryos cultured in vitro versus in the sheep oviduct. **Theriogenology**, Stoneham, n., 46, p.515-525, 1996.

GUTIÉRREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P. RIZOS, D.; WARD, F.A. BOLAND, M.P.; PINTADO, B; DE LA FUENTE, J. Effect of the in vitro cultura system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, n. 55(5), p.1117-1126, 2001.

GUTIERREZ-ADAN A, RIZOS D, FAIR T, MOREIRA PN, PINTADO B, DE LA FUENTE J, BOLAND MP, LONERGAN P. Effect of speed of development on mRNA

expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. **Mol. Reprod Dev.**, New York, 68(4), p.441-8, 2004.

HOLM, P.; SHUKRI, N.N.; VAJTA, G. BOOTH, P.; BENDIXEN, C. CALLESEN, H. Developmental kinetics of the first cell cycles of the bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology**, Stoneham, n., 50, p.1285-1299, 1998.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; CALLESEN, H. Kinetics of Early In Vitro Development of Bovine In Vivo and In Vitro Derived Zygotes Produced and/or Cultured in Chemically Defined or Serum-Containing Media. **Reprod.**, Cambridge, 123, p.553-565, 2002.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, n., Los Altos, v.47, n.1, p.23-32, 1997.

ITO, T., KITO, K., ADATI, N., MITSUI, Y., HAGIWARA, H. AND SAKAKI, Y. Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. **FEBS Letters**, Amsterdam, 351, p.231-236, 1994.

JENSEN, M.R., AUDOLFSSON, T., FACTOR, V.M., THORGEIRSSON, S.S. In vivo expression and genomic organization of the mouse cyclin I gene (Ccn1). **Gene**, Amsterdam, 256(1-2), p.59-67, 2000.

JOZA, N., KROEMER, G., PENNINGER, J.M. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. **Trends Genet.**, London, 18(3), p.142-9, 2002.

JURISICOVA, A. et al. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, n. 51(3), p.243-253, 1998.

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

KANKA, J., BRYOVA, A., DURANTHON, V., OUDIN, J.-F., PEYNOT N. AND RENARD J.P. Identification of differentially expressed mRNAs in bovine preimplantation embryos. **Zygote**, Cambridge, 11, p.43-52, 2003.

KNUDSEN SM, FRYDENBERG J, CLARK BF, LEFFERS H. Tissue-dependent variation in the expression of elongation factor-1 alpha isoforms: isolation and characterisation of a cDNA encoding a novel variant of human elongation-factor 1 alpha. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, 215(3), p.549-54, 1993.

KOJIMA, T., OSHIMA, K., WATANABE, H., KOMATSU, M. Rapid communication: nucleotide sequence of the bovine elongation factor 1 alpha cDNA1. **J. Anim. Sci.**, Champaign, 80(6), p.1696-7, 2002.

LAVOIR, M. C.; KELK, D.; RUMPHN, N.; BARNES, K. J.; BETTERIDGE, K. J.; KING, W. A. Transcription and translation in bovine nuclei transfer embryos. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 57, p. 204-213, 1997.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.48, p.76-86, 1979.

LEYENS, G., DONNAY, I., KNOOPS, B. Cloning of bovine peroxiredoxins-gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse and primate peroxiredoxins. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**; 136(4), p.943-55, 2003.

LEYENS, G., KNOOPS, B., DONNAY, I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Mol Reprod Dev.**, New York, 69(3), p.243-51, 2004.

LI, W.Y., YU, W.D., QI, B., HE, X., WANG, Y.G., LIU, G.S., DU, M. AND CHEN, Q.X. Analysis of gene expression in rabbit nuclear transfer embryos. **Dev. Growth Differ.**, Nagoya, 45, p.543-551, 2003.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Cambridge, 257, p.967-971, 1992.

LIEBFRIED, L., FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.48, p.76-86, 1979.

LÔBO, R.B.; WATANABE, M.R.; GALERANI, M.A.V. VILA, R.A.; WATANABE, Y.F. Effect of Nellore bull variation on embryo in vitro production. **Theriogenology**, Stoneham, n., 51(1), p.348, 1999.

LONERGAN, P. Growth of preimplantation bovine embryos. **Acta Vet. Scand.**, København, 35(4), p.307-320, 1994.

LONERGAN, P. et al. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. **J. Reprod. Fertil.**, Oxford, 109(2), p.355-365, 1997.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M. P. Effect of the time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. **J. Reprod. Fert.**, Oxford, 117, p.159-167, 1999.

LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. P. Bovine Oocyte and Embryo Development Following Meiotic Inhibition with Butyrolactone I. **Mol Reprod Dev.**, New York, 57, p.204-209, 2000.

LONERGAN, P. et al. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.**, Paris, 41, p.427-437, 2001.

LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies, **Reprod. Biom. Online**, 7(6), p.657-663, 2003.

LU, K.H.; GORDON, I.; GALLAGHER, M., MCGOVERN, H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilisation of oocytes matured in vitro. **Vet Rec.**, London, 12;121(11), p.259-60. 1987

LUCE, M.J. AND BURROWS, P.D. Minimizing false positives in differential display. **BioTechniques**, Natick, 24, p.766-770, 1998.

LUEHRSEN, K.R., MARR, L.L., VAN DER KNAAP E. AND CUMBERLEDGE, S. Analysis of Differential display RT-PCR products using fluorescent primers and GENESCAN™ software. **BioTechniques**, Natick, 22, p.168-174, 1997.

MANCINI M, MACHAMER CE, ROY S, NICHOLSON DW, THORNBERRY NA, CASCIOLA-ROSEN LA, ROSEN A. Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. **J Cell Biol.**, New York, 149(3), p.603-12, 2000.

MEIRELLES, F.V.; MERIGHE, G.K.; SCHWARZ, K.L.; GARCIA, S.M.; EMANUELLI, I.P.; RIPAMONTE, P; PUELKER, R.Z.; CARAMBULA, S.F.; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F. Genética e epigenética citoplasmática no desenvolvimento embrionário. **Acta Sci. Vet.**, (31), p.51-57, 2003.

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

MEMILI, E.; DOMINKO, T.; FIRST, N.L.. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, 51(1), p.36-41, 1998.

MEMILI, E.; FIRST, N.L. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. **Biol. Reprod.** Champaign, 61(5), p.1198-207, 1999.

MEMILI, E.; FIRST, N.L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression compared with others species.

Zygote, Cambridge, 8(1), p.87-96, 2000.

MENDEZ, R.; RICHTER, J.D. Translational control by CPEB: a means to the end.

Nat. Rev. Mol. Cell Biol., London, 2(7), p.521-9, 2001.

MIELE, G., MACRAE, L., MCBRIDE, D., MANSON, J. AND CLINTON, M. Elimination of false positive generated through PCR re-amplification of differential display cDNA.

BioTechniques, Natick, 25, p.138-144, 1998.

NAGEL, A., FLEMING J.T. AND SAYLER, G.S. Reduction of false positive in prokaryotic mRNA differential display. **BioTechniques**, Natick, 26, p.641-648, 1999.

NAKAMURA, T., SANOKAWA, R., SASAKI, Y.F., AYUSAWA, D., OISHI, M., MORI, N. Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain. **Exp. Cell Res.**, New York, 221(2), p.534-42, 1995.

NATALE, D.R., KIDDER, G.M., WESTHUSIN, M.E., WATSON, A.J. Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transcript transitions and alpha-amanitin sensitivity during bovine preattachment development. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, 55(2), p.152-63, 2000.

NATALE, D.R., DE SOUSA, P.A., WESTHUSIN, M.E., WATSON, A.J. Sensitivity of bovine blastocyst gene expression patterns to culture environment assessed by differential display RT-PCR. **Reprod.** 122, p.687-693, 2001.

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**, Stoneham, n., 53(1), p.21-34, 2000.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer. **Reprod Biomed Online**, 7(6), p.649-56, 2003.

NOZAWA, K., FRITZLER, M.J., CHAN, E. K. Unique and shared features of Golgi complex autoantigens. **Autoimmun Rev.**, 4(1), p.35-41, 2005.

PACINI, A.; TOSCANO, A.; CESATI, V.; COZZI, A.; MELI, E.; DI CESARE MANNELLI, L.; PATERNOSTRO, F.; PACINI, P.; PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E. NAPOR-3 RNA binding protein is required for apoptosis in hippocampus. **Brain Res Mol Brain Res**. 31;140(1-2), p.34-44, 2005.

PAEZ, J.G.; SELLERS, W.R. Pathway- A Critical Mediator of Ongoing Signaling. Ed. David Frank, 'Signal Transduction in Cancer' Kluwer Academic Publishers, Boston. pp 1-6, 2002.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.31, n.1, p.63-67, 1992.

PIKÓ, L. Synthesis of macromolecules in early mouse embryos cultured in vitro: RNA, DNA and polysaccharide component. **Dev. Biol.** 21, p. 257-279, 1970.

PIKÓ, L.; CLEGG, K.B. Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos. **Dev. Biol.** 89, p.362-378, 1982.

PLANTE, L.; PLANTE, C. SHEPHERD, D.L.; KING, W.A. Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. **Mol. Reprod. Dev.** 39(4), p.375-383, 1994.

QIU, J.J.; ZHANG, W.W., WU, Z.L.; WANG, Y.H.; QIAN, M.; LI, Y.P. Delay of ZGA initiation occurred in 2-cell blocked mouse embryos. **Cell Res**. 13(3), p.179-185, 2003.

REINHARDT, B., FRANK, U., GELLNER, K., LOHMANN, J.U. AND BOSCH, T.C.G. High-resolution fluorescence-based differential display on a DNA sequencer followed by band excision. **BioTechniques**, Natick, 27, p.268-271, 1999.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; ARROYO-GARCIA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIERREZ-ADAN, A. Análisis of Diferencial Menssager RNA Expresión Between Bovine Blastocysts Produced in Differne Cultura Systems: Implications for Blastocyst Quality. **Biol. Reprod.**, Champaign 66, p.589-595, 2002.

RUDDOCK, N.T., WILSON, K.J., COONEY, M.A., KORFIATIS, N.A., TECIRLIOGLU, R.T., FRENCH, A.J. Analysis of imprinted messenger RNA expression during bovine preimplantation development. **Biol. Reprod.**, Champaign 70(4), p.1131-5, 2004.

SASAKI, N.; NAGAOKA, S.; ITOH, M.; IZAWA, M.; KONNO, H; CARNINCI, P.; YOSHIKI, A.; KUSAKABE, M.; MORIUCHI, T.; MURAMATSU, M.; OKAZAKI, Y.; HAYASHIZAKI, Y. Characterization of gene expression in mouse blastocyst using single-pass sequencing of 3995 clones. **Genomics**, 49, p. 167-179, 1998.

SCHEID, M.P.; WOODGETT, J.R. PKB/AKT: Functional Insights from genetic models. **Nature**, 2, p.760-768, 2001.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, 270, p. 467-470, 1995.

SCHULTZ, R.M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. **Bioessays**, 15(8), p.531-8, 1993.

SCHULTZ, R.M. DAVIS, W.Jr.; STEIN, P.; SVOBODA, P. Reprogramming of gene expression during preimplantation development. **J. Exp. Zool.** 15;285(3), p.276-82, 1999.

SCHULTZ, R.M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. **Hum Reprod Update.**, 8(4), p.323-31, 2002.

SEYFERT, H.M., PITRA, C., MEYER, L., ET AL. Molecular characterization of STAT5A- and STAT5B-encoding genes reveals extended intragenic sequence homogeneity in cattle and mouse and different degrees of divergent evolution of various domains. **J Mol Evol.**;50(6), p.550-61, 2000.

SCHEID, V.; DURONIO, M.P. Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 95(13), p.7439-44, 1998.

SHIMADA, M.; TERADA, T. Phosphatidylinositol 3-kinase in cumulus cells and oocytes is responsible for activation of oocyte mitogen-activated protein kinase during meiotic progression beyond the meiosis I stage in pigs. **Biol. Reprod.** 64(4), p.1106-14, 2001.

SIRARD, M.A. et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.40, n.6, p.1257-1263, 1989.

SIRARD, M.A. et al. Potencial and limitations of bovine-specific arrays for the analysis of mRNA level in early development: preliminary analysis using a bovine embryonic array. **Reprod. Fert. Develop.** 17, p.47-57, 2005.

SMITH, L.C., MEIRELLES, F.V., BUSTIN, M., CLARKE, H.J. Assembly of somatic histone H1 onto chromatin during bovine early embryogenesis. **J Exp Zool.**;273(4), p.317-26, 1995.

SMITH, N.R., ALDERSLEY, M., LI, A., HIGH, A.S., MOYNIHAN, T.P., MARKHAM, A.F. AND ROBINSON, P.A. Automated diferencial display using a fluorescently labeled universal primer. **BioTechniques**, Natick, 23, p.274-279, 1997.

STEIN, S.; LIANG, P. Differential display analysis of gene expression in mammals: a p53 story. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 59, p.1274-1279, 2002.

TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 26, n. 1, p. 90-100, 1990.

TESFAYE, D., PONSUKSILI, S., WIMMERS, K., GILLES, M., SCHELLANDER, K. Identification and quantification of differentially expressed transcripts in in vitro-produced bovine preimplantation stage embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, n.66, p.105-114, 2003.

TOTEY, S.M.; PAWSHE, C.H.; APPA RAO, K.B. In vitro maturation of buffalo oocytes: role of insulin and its interaction with gonadotrophins. **J. Reprod. Fert. Suppl.** 50, p.113-119, 1996.

TROUNSON, A.; PUSHETT, D.; MACLELLAN, L.J.; LEWIS, I. GARDNER, D.K. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. **Theriogenology**, Stoneham, n., 41, p.57-66, 1994.

VAN DEN PLAS, J.; MERREGAERT, D. In vitro studies on Itm2a reveal its involvement in early stages of the chondrogenic differentiation pathway. **Biol Cell.** 96(6), p.463-70, 2004.

VANHAESEBROECK, B.; LEEVERS, S.J. PANAYOTOU, G. WATERFIELD, M.D. Phosphoinositide 3-kinase: a conserved family of signal transducers. **Trends Biochem. Sci.** 22(7), p.267-272, 1997.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOLGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, 270, p. 484-487, 1995.

VERCA, M.S.B., VERCA, S.B., RUSCONI, S. AND DREYER, J-L. Modification of primer design facilitates the use of differential display. **BioTechniques**, Natick, 24, p.374-380, 1998.

VIGNEAULT, C.; McGAW, S.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M-A. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. **Biol. Reprod.** 70, p.1701-1709, 2004.

VIUFF, D.; AVERY, B.; GREVE, T.; KING, W.A.; HYTTEL, P. Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos. **Mol Reprod Dev.** 43(2), p.171-9, 1996.

VLAHOS, C.J.; MATTER, W.F.; HUI, K.Y.; BROWN, R.F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). **J Biol Chem.** 18;269(7), p.5241-8, 1994.

WANG, X., LI, X., FEUERSTEIN, G.Z. Use of novel downstream primers for differential display RT-PCR. **BioTechniques**, Natick, 24, p.382-386, 1998.

WARD, F. A.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Paternal Influence on the Time of the First Embryonic Cleavage Post Insemination and the Implications for Subsequent Bovine Embryo Development In Vitro and Fertility In Vivo. **Mol. Reprod. Dev.**, New York v. 60, n. 1, p. 47-55, 2001.

WARNER, C. M.; BRENNER, C. A. Genetic Regulation of Preimplantation Embryo Survival. **C. Top. Dev. Biol.**, v. 52, p. 151-193, 2001.

WARNER, C.M. et al. Genetic regulation of preimplantation mouse embryo survival. **J. Exp. Zool.**, Philadelphia, v.282, p.272-279, 1998.

WATANABE, M.R.; FRANCESCHINI, P.H.; DAYAN, A.; GALERANI, M.A.V.; VILA, R.A.; LÔBO, R.B.; WATANABE, Y.F. Ultrasound guided oocytes recovery in Nellore

cows and in vitro embryo production. **Theriogenology**, Stoneham, n., 51 (1), p. 438, 1999.

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

WATSON, A. J.; WESTHUSIN, M. E.; DE SOUSA, P. A.; BETTS, D. H.; BARCROFT, L. C. Gene Expression Regulating Blastocyst Formation. **Theriogenology**, Stoneham, n., v. 51, p. 117-133, 1999.

WATSON, A. J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L.C.; NATALE, D. URQUHART, J. WESTHUSIN, M.E. Impact of Bovine Oocyte Maturation Media on Oocyte Transcript Levels, Blastocyst Development, Cell Number and Apoptosis. **Biol. Reprod.** 62, 355–364, 2000.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSWE, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. **Reprod. Fert. Dev.** 17, p.23-35, 2005.

WRENZYCKI C, LUCAS-HAHN A, HERRMANN D, LEMME E, KORSWE K, NIEMANN H. In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. **Biol Reprod.**; 66(1), p.127-34, 2002.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of Culture System and Protein Supplementation on mRNA Expression in Pre-implantation Bovine Embryos. **Human Reprod.**, v. 16, p. 893-901, 2001.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Timing of Blastocyst Expansion Affects Spatial Messenger RNA Expression Patterns in Bovine Blastocysts Produced In Vitro. **Biol. Reprod.**, v. 68, p. 2073-2080, 2003.

WRENZYCKI, C.; WELLS, D.; HERRMANN, D.; MILLER, A.; OLIVER, J.; TERVIT, R.; NIEMANN, H. Nuclear Transfer Protocol Affects Messenger RNA Expression Patterns in Cloned Bovine Embryos. **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 309-317, 2001.

WU, L.; FENG, H.; WARNER, C. M. Identification of Two Major Histocompatibility Complex Class Ib Genes, Q7 and Q9, as the *Ped* Gene in the Mouse. **Biol. Reprod.**, 60, p.1114-1119, 1999.

WYMAN, M.P.; PIROLA, L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinase. **Biochem. Biophys. Acta**, 1436(1-2), p. 127-150, 1998.

WYMAN M.P.; ZVELEBIL, M.; LAFFARGUE, M. Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? **Trends Pharmacol Sci.** 24(7), p.366-76, 2003.

YANG, Y.B.; LU, K.H. The influence of bovine oocyte type on in vitro fertilization and subsequent in vitro development. **Theriogenology**, Champaign, v.33, p.355, 1990.

YANO, H.; NAKANISHI, S.; KIMURA, K.; HANAI, N.; SAITOH, Y.; FUKUI, Y.; NONOMURA, Y.; MATSUDA, Y. Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. **J Biol Chem.** 5;268(34), p.25846-56, 1993.

ZHAO, S., MOLNAR, G., ZHANG, J., ZHENG, L. AVERBOUKH, L. AND PARDEE, A.B. 3'-end cDNA pool suitable for differential display from small number of cells. **BioTechniques**, Natick, 24, p.842-852, 1998.

ZIMMERMANN, J.W.; SCHULTZ, R.M. Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: Use of mRNA differential display. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91, p.5456-5460, 1994.