



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ESTUDO DE GENES CANDIDATOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO BOVINO EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE  
EMBRIÕES**

**Tatiane Carmo Duarte Mundim**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**BRASÍLIA/DF**  
**NOVEMBRO/2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ESTUDO DE GENES CANDIDATOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO BOVINO EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE  
EMBRIÕES**

**Tatiane Carmo Duarte Mundim**

**ORIENTADOR: Rodolfo Rumpf**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PUBLICAÇÃO: 312/2008**

**BRASÍLIA/DF**  
**NOVEMBRO/2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ESTUDO DE GENES CANDIDATOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO BOVINO EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE  
EMBRIÕES**

**Tatiane Carmo Duarte Mundim**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA E  
MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE PRODUÇÃO  
ANIMAL.**

---

**MAURÍCIO MACHAIM FRANCO, Dr. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)**  
**(CO-ORIENTADOR) CPF: 517.692.476-53**  
**E-mail: [mfranco@cenargen.embrapa.br](mailto:mfranco@cenargen.embrapa.br)**

**APROVADA POR:**

---

**RODOLFO RUMPF, PhD (FAV / UnB e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)**  
**(ORIENTADOR) CPF: 295.718.049-91**  
**E-mail: [rodolfo@cenargen.embrapa.br](mailto:rodolfo@cenargen.embrapa.br)**

---

**JAIRO PEREIRA NEVES, Dr. (FAV / UnB)**  
**(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 065863509-30**  
**E-mail: [jpneves@unb.br](mailto:jpneves@unb.br)**

---

**MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)**  
**(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 395928980-49**  
**E-mail: [margot@cenargen.embrapa.br](mailto:margot@cenargen.embrapa.br)**

**BRASÍLIA/DF, 18 de Novembro de 2008.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Mundim, Tatiane Carmo Duarte

Estudo de genes candidatos associados ao desenvolvimento embrionário bovino em diferentes sistemas de produção de embriões  
Orientação de Rodolfo Rumpf. – Brasília, 2008.

73p.: il.

Dissertação de Mestrado ( M ) – Universidade de Brasília /  
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária , 2008.

1. Bovino. 2. Embriões. 3. Expressão Gênica. 4. ARTs.  
I. Rumpf, R. II. PhD.

MUNDIM, T.C.D. **Estudo de genes candidatos associados ao desenvolvimento embrionário bovino em diferentes sistemas de produção de embriões.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 72p. Dissertação de Mestrado.

### CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Tatiane Carmo Duarte Mundim

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: **Estudo de genes candidatos associados ao desenvolvimento embrionário bovino em diferentes sistemas de produção de embriões.**

GRAU: Mestre ANO: 2008

É concedida a Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

Tatiane Carmo Duarte Mundim

CPF:288538538-32

Brasília / DF – Brasil

Telefone: 34484774

e-mail: [tatianemundim@yahoo.com.br](mailto:tatianemundim@yahoo.com.br)

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade”.

Carlos Drummond de Andrade

Dedico esse trabalho

aos meus maravilhosos pais,

Anilton e Beide

À minha irmã Poliana

E ao meu amado Alexandre.

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

Se nesses anos de trabalho e ausência me esqueci de dizer, digo agora:

Amo-os de todo o meu coração!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por ter me fortalecido e me erguido todas as vezes que me senti desmotivada pelo cansaço e pelos obstáculos impostos, mas principalmente por ter me dado a confiança de que tudo posso naquele que me fortalece.

Aos meus pais, Anilton e Beide, a minha irmã Poliana e a minha Suzy, por todo amor a mim concedido, pelo apoio emocional e pelo incentivo, por serem o meu porto seguro, pra onde sei que sempre poderei retornar tranquila.

Ao meu fiel companheiro Alexandre por todo amor, apoio, compreensão e força, por tudo que és e fazes por mim.

Ao Dr. Rodolfo Rumpf pela orientação, ensinamentos e por todas as oportunidades que me concedeu antes, durante e depois desse trabalho. Por toda consideração, respeito e confiança em mim depositados.

Ao Dr. Maurício Machaim Franco por toda orientação, ensinamentos, amizade e confiança. Nesses anos ao seu lado pude aprender não somente as técnicas, instrumentos de pesquisa, mas sobretudo a “fazer ciência”, com a aptidão de que é detentor. Com muito carinho, obrigada por tudo!

A Dra. Margot A. N. Dode por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, por acreditar em mim e por todas as oportunidades que me proporcionaram tantos aprendizados e realizações. A você gostaria de deixar meus sinceros agradecimentos e admiração.

Ao Dr. Jairo Pereira Neves por todo carinho e respeito e pelos incentivos que me ajudaram a realizar esse trabalho.

A minha companheira de trabalho e grande amiga Edylaine A. Castro, obrigada por toda amizade, força e companheirismo durante todos esses anos.

A todos os integrantes e ex- integrantes do LRA e fazenda Sucupira: Ana Cláudia, Valquíria, Clarice, Dr. Eduardo Melo, Dr. Roberto Sartori, Regivaldo, Ligiane, Ester, Georgia, Marcelo, Grazieli, José e Chivas.

Aos amigos Dr. Alexandre Ramos, Dr. Ivo Pivato, Anísio, Urías e todos os funcionários da fazenda Sucupira. Vocês além de companheiros de trabalho foram grandes colaboradores, de forma muito especial, para a realização desse trabalho.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela estrutura e condições oferecidas para a realização desse trabalho.

A UnB pela formação acadêmica e profissional.

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

## ÍNDICE

RESUMO-----	xiv
ABSTRACT-----	xvi
ÍNDICE DE TABELAS-----	x
ÍNDICE DE FIGURAS-----	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES-----	xii
1.INTRODUÇÃO-----	18
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	20
2.1 O <i>imprinting</i> genômico e a reprogramação epigenética durante o desenvolvimento embrionário inicial-----	22
2.2 Os Genes IGF-II e IGF-IIR-----	25
2.3 O Gene GRB-10-----	26
2.4 Estresse oxidativo e genes relacionados-----	26
2.5 Apoptose e o gene BAX-----	28
2.6 Reconhecimento materno da gestação e o gene INF- $\tau$ -----	31
3.OBJETIVOS-----	33
4.HIPÓTESE-----	34
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	35
CAPÍTULO ÚNICO-----	40
EMBRIÃO PRODUZIDO POR HIPERESTIMULAÇÃO HORMONAL É UM CONTROLE ADEQUADO PARA O ESTUDO DE PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM EMBRIÕES PIV?	

RESUMO-----	41
ABSTRACT-----	43
1.INTRODUÇÃO-----	45
2.MATERIAL E MÉTODOS-----	47
2.1 Animais -----	47
2.2 Produção e coleta dos embriões-----	48
2.3 Extração de RNA-----	51
2.4 Transcrição Reversa-----	52
2.5 PCR semi-quantitativo-----	52
2.6 Quantificação-----	53
2.7 Estatística-----	53
3.RESULTADOS-----	56
4.DISSCUSSÃO-----	60
5.CONCLUSÃO-----	66
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	67

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.** Protocolo utilizado para a superestimulação hormonal dos animais-----49

**Tabela 2.** Sequência de Primers e tamanhos dos produtos amplificados para cada gene usado na  
avaliação da expressão gênica-----55

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Quantidade relativa (média  $\pm$  erro padrão) do gene GRB-10 em embriões produzidos por diferentes sistemas: ovulação natural (OVN), superovulação (SOV) e *in vitro* (PIV). Para cada tratamento foram utilizados 3 pools de 15 embriões. Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos ( $P < 0,05$ )-----56

**Figura 2.** Análise de correlação da expressão dos genes GRB-10, IGF-II e IGF-IIR entre embriões produzidos por diferentes sistemas: ovulação natural (OVN), superovulação (SOV), e *in vitro* (PIV). a) OVN vs. PIV; b) OVN vs. SOV; c) PIV vs. SOV -----57

**Figura 3.** Soma da quantidade relativa de mRNA (média  $\pm$  erro padrão) dos genes MnSOD, GPX4 e CATALASE para cada fonte de embrião: ovulação natural (OVN), superovulação (SOV) e *in vitro* (PIV).  $n = 9$  -----58

**Figura 4.** Soma da quantidade relativa de mRNA (média  $\pm$  erro padrão) de todos os genes em cada tratamento: ovulação natural (OVN), superovulação (SOV) e *in vitro* (PIV). Letras diferentes indicam diferenças entre grupos( $P < 0,05$ ).  $n = 24$ -----59

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

**ARTs** Assisted Reproductive Technologies (Tecnologias de reprodução assistida)

**bp** pares de base

**cDNA** DNA complementar

**CIV** Cultivo *in vitro*

**CCO** Complexo *cumulus*-oócito

**DNA** Ácido Desoxirribonucléico

**Dnmt** DNA metiltransferases

**D-PBS** Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

**FIV** Fecundação *in vitro*

**FSH** Hormônio Folículo Estimulante

**GAPDH** “*Glyceraldehyde-2-phosphate dehydrogenase*” (Glutaraldeído-2-fosfato desidrogenase)

**GPX-4** (Glutathione Peroxidase 4)

**GRB-10** “*growth factor receptor-bound protein-10*” (Proteína 10 ligada a Receptor de Fator de Crescimento)

**IA** Inseminação artificial

**IGF-II** “*Insulin-like growth factor II*” (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 2)

**IGF-IIR** “*Insulin-like growth factor II receptor*” (Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 2)

**INF-  $\tau$**  Interferon - tau

**MIV** Maturação *in vitro*

**MnSOD** Manganês superóxido desmutase

**OVN** Ovulação natural

**PBS** Solução salina com tampão fosfato

**PCR** Reação em Cadeira da Polimerase

**PGF-<sub>2α</sub>** Prostaglandina

**PIV** Produção *in vitro*

**RNA** Ácido Ribonucléico

**ROS** Espécies reativas de oxigênio

**RT-PCR** Transcrição Reversa por PCR

**mRNA** RNA mensageiro

**SOV** Superovulação

**TCM-199** “*Tissue Culture Medium 199*”

**TE** Transferência de Embrião

**UV** Ultra-violeta

# **EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO BOVINO EM DIFERENTES TIPOS DE PRODUÇÃO DE EMBRIÕES**

## **RESUMO GERAL**

Embriões produzidos por hiperestimulação hormonal são usados como controle *in vivo* na maioria das publicações relacionadas à expressão gênica. Entretanto, ainda não se sabe se esses embriões são os controles mais apropriados a serem utilizados em estudos de perfil da expressão gênica. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi comparar a expressão dos genes candidatos relacionados ao desenvolvimento embrionário bovino: GRB-10, IGF-II, IGF-IIR, MnSOD, GPX-4, CATALASE, BAX, e INTERFERON- $\tau$ , entre embriões produzidos *in vivo* através de superovulação (SOV), através de Produção *in vitro* (PIV) e *in vivo* produzidos por ovulação natural, sem nenhuma estimulação hormonal (OVN). A comparação foi realizada através da técnica de RT-PCR usando  $\beta$ -ACTIN e GAPDH como os controles constitutivos. Quando a expressão individual dos genes foi analisada, GRB-10 foi menos expresso em embriões OVN do que em SOV ( $P = 0,04$ ) e PIV ( $P = 0,01$ ), no entanto, nenhuma diferença foi encontrada entre os outros genes. Genes relacionados à resposta ao estresse foram agrupados e comparados entre os diferentes tipos de embriões. A soma da expressão dos genes MnSOD, GPX-4, CATALASE tende ( $P = 0,10$ ) a ser maior em embriões PIV do que em OVN. A expressão de todos os genes estudados foi também somadas para cada tratamento, e a expressão gênica geral foi menor em embriões OVN quando comparados com embriões de SOV ( $P = 0,06$ ) ou de PIV ( $P = 0,04$ ). Nenhuma diferença foi observada entre os embriões SOV e PIV ( $P = 0,70$ ). Finalmente, os genes foram agrupados de acordo com suas funções, relacionadas ao desenvolvimento embrionário (GRB-10, IGF-II e IGF-IIR), a resposta ao estresse (MnSOD,

GPX-4 e CATALASE) e a qualidade embrionária (BAX, INTERFERON- $\tau$ ). A análise de correlação foi realizada e mostrou um comportamento distinto nos embriões de OVN quando comparados com os de SOV ( $r = -0,9429$ ) e com os de PIV ( $r = -0,8833$ ) para os genes GRB-10, IGF-II e IGF-IIR. No entanto, o comportamento desses genes foi similar para os embriões de SOV e de PIV ( $r = 0,9890$ ). Concluimos que a estimulação hormonal ovariana afeta os embriões através da alteração de sua expressão gênica. Portanto, se os embriões de SOV tiverem que ser usados como controle em estudos de expressão gênica, os dados deverão ser analisados com cautela.

**Palavras-chave:** Embriões, Bovino, Expressão Gênica e ARTs.

# EXPRESSION OF CANDIDATE GENES RELATED TO BOVINE EMBRYONIC DEVELOPMENT IN DIFFERENT TYPES OF EMBRYO PRODUCTION

## ABSTRACT

Embryos produced by hormonal hyperstimulation are used as “*in vivo*” control in the majority of publications related to gene expression. However, if those are the most appropriated control for gene expression profile studies it is not known. Thus, the objective of this study was to compare the expression of GRB-10, IGF-II, IGF-IIR, MnSOD, GPX-4, CATALASE, BAX, and Interferon- $\tau$  genes among embryos produced *in vivo* by hormonal hyperstimulation (SOV), by *in vitro* fertilization (IVF) or *in vivo* without any hormonal stimulus (NOV). Comparison was performed using a semi-quantitative RT-PCR using  $\beta$ -Actin and GAPDH as constitutive controls. When the individual gene expression was analyzed, GRB-10 was less expressed in NOV than SOV ( $P = 0.04$ ) and IVF ( $P = 0.01$ ) embryos, whereas no differences were found for the other genes. Then, genes related to stress response were grouped and compared among the types of embryos. The sum of expression of MnSOD, GPX-4, CATALASE genes tended ( $P = 0.10$ ) to be greater in IVF than NOV embryos. The expression of all studied genes were also added together for each treatment, the “overall” gene expression was lower in the NOV embryos when compared with SOV ( $P = 0.06$ ) or IVF ( $P = 0.04$ ). No difference was observed between the SOV and IVF embryos ( $P = 0.70$ ). Finally, genes were grouped according to their function as being related to embryo development (GRB-10, IGF-II, IGF-IIR), stress response (MnSOD, GPX4, CATALASE) and embryo quality (BAX, INTERFERON $\tau$ ). A correlation analysis was performed and showed a distinct behavior for NOV embryos when compared with SOV ( $r = -0.9429$ ) or IVF ( $r = -0.8833$ ) for GRB-10, IGF-II and IGF-IIR genes. However, the behavior of

those genes was similar for SOV and IVF embryos ( $r = 0.9890$ ). We conclude that ovarian hormonal stimulation affects embryos by altering their gene expression. Therefore, if SOV embryos have to be used as experimental control for gene expression studies, data should be analyzed with caution.

**Key words:** Embryos, Bovine, Gene Expression, ARTs

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento da pecuária, o aumento dos índices reprodutivos e produtivos, bem como a maior disseminação de material genético superior nos rebanhos têm sido alvo de muitos estudos e investimentos, o que tem permitido um grande avanço e desenvolvimento de diversas biotécnicas ligadas à reprodução animal. Essas biotecnologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de otimizar a produção animal, auxiliando na identificação, seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores.

Apesar de muitos avanços, ainda existem vários fatores que afetam a eficiência dessas biotécnicas de reprodução. Dentre eles, pode-se citar a manipulação de ovócitos e embriões e as condições ambientais *in vitro*, principalmente a composição dos meios de cultivo e maturação (Fairburn *et. al*, 2002; Khosla, *et. al*, 2001). Esses fatores podem ser os responsáveis pelas diferenças nas taxas de eficiência quando se compara a transferência de embriões (TE), produção *in vitro* de embriões (PIV) e a clonagem por transferência nuclear. Dentre várias causas possíveis, pode-se considerar como muito importantes as alterações nos padrões de metilação no

DNA e conseqüentes alterações na expressão de genes *imprinted*, tanto em células quanto em embriões.

A metilação no DNA é um importante fator epigenético e está envolvida no processo de controle da expressão gênica, regulando a expressão dos genes *imprinted* (Reik et al., 2001 e Li, 2002). Os estudos de expressão gênica de genes *imprinted* podem contribuir para a melhoria da eficiência da transferência de embrião, produção *in vitro* de embriões e clonagem. O cultivo *in vitro*, assim como a estimulação hormonal produzida na superovulação podem alterar o padrão de metilação do DNA, modificando portanto, a expressão gênica (Khosla et al., 2001).

Além disso, dentre os vários fatores que afetam a eficiência das técnicas de produção *in vitro*, o estresse oxidativo causado pela produção de radicais livres durante o cultivo tem recebido especial atenção nos últimos anos. As conseqüências desses danos oxidativos podem ser evidenciadas no desenvolvimento retardado dos embriões, nas disfunções metabólicas e até mesmo no aumento e aceleração da apoptose (Guérin *et al.*, 2001).

Assim, estudos de expressão gênica são ferramentas que vieram com um enorme potencial para auxiliar os métodos tradicionais de avaliação de eficiência de produção de embriões.

Os genes que serão avaliados neste experimento são: genes *imprinted*, relacionados ao desenvolvimento embrionário (IGF-II, IGF-IIR e GRB-10), genes relacionados ao estresse oxidativo (MnSOD, GPX-4 e Catalase), gene de controle da apoptose (BAX) e gene de qualidade embrionária (INF- $\tau$ ). Todos estes são potenciais candidatos a marcadores moleculares, baseado em suas funções fisiológicas, e respectivamente, relacionados ao desenvolvimento embrionário (Wilkins e Haig, 2003), resposta do embrião às agressões do meio e qualidade embrionária (Rizos *et al.*; 2003 e Rizos *et al.*; 2004), com a finalidade de se tornarem mais uma alternativa para avaliar a qualidade do embrião e conseqüentemente, aumentar a produção desses.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

O padrão de expressão gênica, durante o desenvolvimento embrionário, tem fundamental importância para o metabolismo em diferentes etapas, como as clivagens iniciais, a ativação genômica que ocorre no estágio entre 8-16 células em bovinos, a compactação da mórula e a diferenciação celular e/ou formação do blastocisto. Alterações no padrão de expressão gênica podem afetar a viabilidade de embriões (Bertoline et al., 2002).

Apesar de grandes progressos na produção de embriões *in vitro*, esses embriões ainda diferem dos produzidos *in vivo* na morfologia, metabolismo (Khurana and Niemann, 2000) e expressão gênica (Niemann & Wrenzycki, 2000).

Diferenças na expressão de genes e conseqüentemente na qualidade embrionária podem ocorrer quando se compara os diferentes tipos de produção de embriões, como por exemplo o sistema *in vivo* com o cultivo *in vitro*. Quando se compara diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, também são observadas alterações, uma vez que, embriões no estágio de pré-implantação são capazes de se desenvolverem em condições inadequadas de cultivo, modificando o perfil de genes importantes para o desenvolvimento (Lonergan et al., 2006).

Natale *et. al*, 2001 citam a importância de se estudar a expressão gênica em embriões para se monitorar a qualidade dos meios de cultivo. Herman *et. al*, 1996 mostram a importância do entendimento dos mecanismos de metilação no DNA, os quais estão diretamente ligados aos mecanismos de *imprinting genômico* (Li, 2002), que podem ter seus padrões alterados quando indivíduos são clonados, com isso alterando a expressão gênica e conseqüentemente a eficiência da técnica.

Quando embriões bovinos são expostos à condições de cultivo adversas, eles suportam um enorme grau de flexibilidade para se adaptarem ao meio ou para ajustar seus programas de desenvolvimento às condições subótimas de cultivo, no entanto, quando a capacidade de compensação é sobrecarregada, o desenvolvimento é comprometido e pode resultar em anormalidades (Niemann & Wrenzychi, 2000).

Segundo Baumann et al., 2007, a qualidade de um embrião produzido *in vivo* é maior do que o produzido *in vitro* e de acordo com a *quiet embryo hypothesis* tem um metabolismo mais reduzido que o *in vitro*. Além disso, o embrião *in vitro* tem uma capacidade reduzida de sobreviver a criopreservação e possuem uma menor taxa de gestação do que os *in vivo*, após a transferência.

Assim como o cultivo *in vitro*, a estimulação hormonal, utilizada na superovulação, pode alterar o padrão de metilação do DNA, alterando a expressão de certos genes (Khosla, 2001).

Fortier et al., 2008 sugeriram que a superovulação ou seus efeitos subsequentes, comprometem a qualidade do ovócito (podendo ser devido a ovulação de ovócitos anormais, ou por forçar os ovócitos a um desenvolvimento rápido) e interfere negativamente na manutenção do *imprinting* (através da alteração do meio do oviduto e/ou do útero) durante o desenvolvimento pré-implantacional e podem ter sérias implicações clínicas após o nascimento.

Rivera et al, 2008, constataram que a manipulação de embriões (transferência de embriões) causa a diminuição da expressão de muitos genes *imprinted* em tecidos extraembrionários durante o período pós-implantacional.

Condições de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, assim como os processos de superovulação vêm sendo estudados, estimulando a procura de novos protocolos que aperfeiçoem as técnicas e reduzam o custo, na tentativa de buscar a produção de embriões que

mais se assemelhem, em competência e qualidade, ao embrião produzido naturalmente *in vivo*. Assim sendo, a biologia molecular, na tentativa de identificar marcadores moleculares e mecanismos envolvidos na expressão diferencial de genes surge como potencial ferramenta de monitoramento e avaliação de sistemas de produção de embriões.

## **2.1 O *imprinting* genômico e a reprogramação epigenética durante o desenvolvimento embrionário inicial**

O *imprinting* genômico é considerado uma marca epigenética que controle a expressão de genes *imprinted*, cuja a expressão depende da origem parental dos mesmos. A epigenética consiste no estudo de alterações na função gênica que não estão relacionadas à sequência primária do DNA. Os genes *imprinted* estão envolvidos na interação mãe-prole, no crescimento e função placentária e conseqüentemente influenciam no desenvolvimento embrionário. (Isles & Holland, 2005).

O *imprinting* é estabelecido durante a gametogênese de forma sexo-específica e transmitida para o zigoto. (Waterland & Michels, 2007). Diferencia-se da genética clássica mendeliana uma vez que regiões de cromossomos homólogos não apresentam equivalência funcional, onde somente um dos alelos, embora ambos estejam presentes, estará funcionalmente ativo enquanto o outro silenciado.

O mecanismo de silenciamento desses genes é conhecido por envolver uma série de modificações complexas, que incluem a marcação epigenética por metilação de DNA alelo-específica em regiões do genoma ricas em dinucleotídeos CpG e/ou modificações nas histonas com acetilação e metilação. Essa marcação epigenética diferencial dos cromossomos parentais

resulta em uma leitura diferencial pela maquinária transcricional e como consequência, a expressão gênica é somente de um alelo parental (Isles & Holland, 2005).

O imprinting genômico é vital para um padrão de expressão gênica normal em um indivíduo, erros muitas vezes resultam em uma transcrição gênica inapropriada ou até mesmo a repressão da mesma (Swales & Spears, 2005).

Diversas teorias foram propostas para explicar a ocorrência do *imprinting* genômico. Dentre elas, a mais aceita é a chamada teoria do conflito, também conhecida por “batalha dos sexos”. Essa teoria baseia-se no interesse tanto do macho quanto da fêmea em obter o número máximo de proles viáveis com a finalidade de manter seus genes na população. Como a reprodução poligâmica é comum em mamíferos, o macho tem o interesse de assegurar o crescimento de sua prole, e assim recruta o máximo de recursos possíveis da fêmea visando beneficiar a progênie, para que a mesma seja maior e mais forte, aumentando as chances de sobrevivência no meio, mesmo que isso ocorra em detrimento da fêmea pela utilização de mais nutrientes maternos. Em contrapartida, a fêmea deve limitar o crescimento embrionário e fetal para que a mesma esteja apta a reproduzir-se novamente, com outro macho. As fêmeas que conseguem restringir o crescimento fetal e produzir maior número de proles com a limitação de recursos conseguem, a longo prazo, ter mais êxito em suas vidas reprodutivas (Hunter, 2007).

O DNA genômico passa por mudanças significativas de metilação do DNA durante a embriogênese. Essas mudanças são estágio de desenvolvimento e sexo dependentes, sendo importantes para o estabelecimento e controle dos genes *imprinted*.

Durante a gametogênese, os genomas paterno e materno encontram-se separados. É nesse período que os eventos de marcação dos *imprints* ocorrem, ou seja, os alelos *imprinted* são diferencialmente marcados para permitir sua expressão sexo-específica. Antes do

estabelecimento dessas marcações sexo-específicas, os *imprints* são apagados, ocorre uma ampla demetilação de todo genoma no início do desenvolvimento das linhagens primordiais germinativas. O momento de aquisição dos *imprints* genômicos é significativamente diferente entre as duas linhagens germinativas (Lee et al., 2002).

Os padrões de estabelecimento das metilações nos genes *imprinted* dos espermatozóides e dos ovócitos depende da atividade das enzimas DNA metiltransferases (Dnmt). A correta regulação das atividades Dnmts, no estabelecimento do status alelo específico de expressão nos alelos parentais é muito importante para que não haja prejuízo do potencial de desenvolvimento embrionário e fetal (Waterland & Michels, 2007).

Durante a embriogênese, ocorre uma alteração no padrão de metilação. Todas as diferenças alélicas são perdidas quando células germinativas primordiais desenvolvem-se no embrião. Independentemente do sexo, os padrões de metilação prévios são apagados e os genes ficam tipicamente desmetilados. Depois, um padrão de metilação específico para cada sexo é imposto. A extensão da metilação está sob controle de uma seqüência específica de DNA chamada Centro de Imprinting. O efeito do Centro de Imprinting em regular a estrutura e a metilação da cromatina se estende por centenas de quilobases de DNA adjacentes. Tendo em mente que tudo isso é um processo normal, o imprinting genômico é passível de erros. Os erros mais comuns são uma mutação em um gene que sofre imprinting, se a mutação for no alelo silenciado, nenhum efeito pode ser obviamente esperado, mas se ocorrer no alelo ativo, haverá ausência de produção de uma determinada proteína; pode ser no Centro de Imprinting, no qual acometerá um número maior de genes devido à sua abrangência maior; ou, ainda, pode ser por dissomia uniparental (Lee et al., 2002).

Dentre os diversos genes *imprinted* já descritos, os genes IGF-II, IGF-IIR e o GRB-10, têm sido muito estudados devido à importância dos mesmos durante o desenvolvimento embrionário.

## 2.2 Os genes IGF-II e IGF-IIR

O gene *imprinted* IGF-II (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2) possui *imprint* materno e é expresso pelo alelo paterno (Goodall & Schmutz, 2003). É considerado um potente mitógeno que desempenha importante função na diferenciação celular, desenvolvimento do cérebro, no crescimento fetal e desenvolvimento da placenta (Reik et al., 2001).

É um gene altamente conservado, e atua ligando-se ao receptor de IGF-I e ao receptor de insulina tipo A (Murphy & Jirtle, 2003), atuando em uma regulação autócrina/parácrina dose dependente. Essas ligações ocorrem para iniciar e propagar os sinais que induzem o crescimento e bloquear a apoptose. Além de ser o principal fator de crescimento fetal, o IGF-II na placenta regularia a difusão e trocas de nutrientes com o feto, a disponibilidade de glicogênio e o transporte de aminoácidos.

Em contraste ao IGF-II, o gene *imprinted* IGF-IIR (receptor do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2) possui *imprint* paterno e é expresso pelo alelo materno. A proteína IGF-IIR não está envolvida na transdução de sinais, mas atua sequestrando o excesso de IGF-II, evitando sua ligação ao receptor do tipo I. O IGF-IIR liga-se ao IGF-II transportando-o para o interior de lisossomos para que ocorra a sua degradação (Murphy & Jirtle, 2003). Desta maneira, corroborando com a teoria do conflito, o IGF-IIR, expresso materno, atua restringindo o crescimento fetal enquanto que o IGF-II, expresso paterno, o promove, e o equilíbrio entre a expressão e disponibilidade de proteínas para esses dois genes *imprinted* é que regula o desenvolvimento embrionário e fetal (Moore, 2001).

### **2.3 O gene GRB-10**

O GRB-10 (*growth factor receptor-bound protein-10*) faz parte de uma família de proteínas adaptadoras que está envolvido em ligações à receptores tirosina quinase como à regulação de sinais do receptor de insulina e o receptor de IGF-I. Assim, está envolvido em vários processos celulares incluindo a regulação do crescimento celular e metabolismo, apoptose e migração celular (Dufresne, 2005).

Em camundongos, foi identificado como gene *imprinted*. É expresso maternalmente na maioria dos tecidos e parece estar expresso em todos os estágios embrionários (2, 4, 8 e 16-32 células, mórula, blastocisto D7 e blastocisto expandido D8) além de ovócitos maduros em bovinos (Ruddock et al., 2004).

Tem sido caracterizado como um supressor de crescimento (Wang, 2007). Charalambous et al. (2003), demonstraram que a perda da função do GRB-10 resultou em super-crescimento fetal e placentário. Além disso, foi observado que o GRB-10 além de inibir a atividade quinase do receptor de insulina por ligação direta a ele, também regula negativamente a sinalização da insulina mediando a estimulação da degradação do receptor de insulina (Ramos et al., 2006).

### **2.4 Estresse Oxidativo e genes relacionados**

A possibilidade da produção de radicais livres nos sistemas *in vitro* pode atingir níveis que comprometam a qualidade do embrião, conseqüentemente afetando a eficiência das técnicas de produção. Sendo assim, a avaliação de genes marcadores envolvidos nos mecanismos de degradação desses radicais produzidos poderá oferecer mais um parâmetro para melhor avaliação desses sistemas.

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes, a favor dos oxidantes, decorrente da presença de radicais livres, prejudicando a integridade celular. Esses

radicais possuem espécies reativas de oxigênio (ROS) em sua constituição, sendo estas formadas a partir das reações de redução de oxigênio ( $O_2$ ). As principais ROS encontram-se nos radicais: superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxil (OH) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que correspondem à redução de um, três e dois elétrons, respectivamente (Guérin *et al.*, 2001).

A produção de radicais livres faz parte da fisiologia da célula, porém em excesso podem causar danos às mesmas, levando ao estresse oxidativo. As consequências desses danos oxidativos podem ser evidenciadas no desenvolvimento retardado dos embriões, nas disfunções metabólicas e até mesmo no aumento e aceleração da apoptose (Guérin *et al.*, 2001).

Existe um sistema de reparo ao estresse oxidativo que entra em ação para evitar que ocorram danos às células. Consiste no sistema de defesa da célula, chamada de defesa antioxidante, que é definida como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação desse. Os antioxidantes podem ser divididos em não enzimáticos e enzimáticos. Dentre os enzimáticos, destacam-se: superóxido dismutase/MnSOD, Catalase, Glutathione Peroxidase/GPX-4.

As enzimas antioxidantes manganês superóxido desmutase (MnSOD), Catalase e glutathione peroxidase (GPX-4) protegem embriões contra danos oxidativos, ou seja, fazem a eliminação de espécies oxigênio reativas que são produzidas durante o estresse oxidativo (Guérin *et al.*, 2001).

O MnSOD atua transformando duas moléculas de ânion superóxido em água e peróxido de hidrogênio, é uma enzima antioxidante que tem função principalmente de proteger os componentes mitocondriais do superóxido liberado normalmente como produto da respiração. Assim, o MnSOD é considerado a defesa primária das células contra danos causados por radicais livres.

A Catalase é uma enzima intracelular encontrada na maioria dos organismos que decompõem o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é um produto decorrente do metabolismo celular em organismos expostos ao oxigênio atmosférico e está relacionado a diversas patologias ligadas ao estresse oxidativo. Sendo tóxico para as células, o peróxido de hidrogênio tem de ser rapidamente convertido numa espécie química que seja inócua e a catalase é quem realiza a desintoxicação do organismo por essa substância.

O GPX-4 é responsável por catalisar a redução do peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos orgânicos e peróxidos lipídicos através da redução da glutatona e de funções de proteção celular contra danos oxidativos.

Dessa forma, esses genes estão relacionados com a capacidade de resposta dos embriões ao meio e conseqüentemente com a produção e qualidade desses embriões frente à condições adversas.

## **2.5 Apoptose e o gene BAX**

Apoptose é um processo conhecido como morte celular programada que requer energia e síntese protéica para a sua execução e faz parte da homeostase dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose. É um processo observado no desenvolvimento embrionário, na organogênese, na renovação de células epiteliais e hematopoiéticas, na involução de alguns órgãos e na regressão de neoplasias (Coelho, 1997). É controlado por mecanismos moleculares e pode ser induzido por uma variedade de estímulos externos e internos.

Um embrião saudável procura manter um equilíbrio apropriado de fatores pró e anti-apoptóticos. Esse equilíbrio é essencial para a sobrevivência embrionária, principalmente durante a ativação do genoma, pois a incapacidade de manter esse equilíbrio leva a ativação da cascata

de apoptose, podendo ter como consequência o bloqueio do seu desenvolvimento e a morte (Meirelles et al., 2004).

Durante o desenvolvimento embrionário inicial, a habilidade do embrião em responder a diferentes fatores de estresse pode ser controlado pela indução do programa de morte celular ou programa de proteção celular incluindo genes induzidos por estresse (Badr et al., 2007).

Segundo o mesmo autor, a apoptose pode seletivamente eliminar os blastômeros anormais, em diferentes estágios do desenvolvimento, sem afetar as células embrionárias remanescentes, ordenadas a ajustar a normalidade dos embriões submetidos a condições subótimas do meio.

A apoptose promove a eliminação de células com núcleo anormal e com anomalias cromossômicas, como 2 núcleos, nenhum núcleo (Hardy, 1999) ou células poliplóides, particularmente, em embriões provenientes de PIV.

Através da apoptose, embriões podem eliminar uma parte da massa celular interna do blastocisto, que ainda tenha potencial para formar trofotoderma, reduzindo o risco de uma expressão ectópica inapropriada do trofotoderma, durante a diferenciação das células germinativas (Badr et al., 2007).

Dentre as possíveis causas de apoptose em embriões durante a fase de preimplantação estão as condições artificiais subótimas (MIV, FIV e CIV) que podem influenciar a ocorrência de anormalidades cromossômicas como poliploidias, juntamente com o estresse celular ou a falta do balanço nutricional durante a PIV (Badr et al., 2007).

A ativação inadequada do genoma embrionário durante o CIV também pode influenciar no processo da apoptose. Esse processo é geneticamente governado por uma cascata de genes

específicos envolvidos na regulação da sobrevivência do embrião no estágio de preimplantação e é dependente de uma série de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas (Badr et al., 2007).

Dentre os genes envolvidos nessa cascata e de grande importância na avaliação de qualidade durante o desenvolvimento embrionário, está o gene BAX. O BAX é o primeiro membro pró-apoptótico, que quando está super expresso, a via celular de apoptose se desencadeia (Yang & Rajamendran, 2002), sendo portanto, utilizado em muitos estudos que avaliam a qualidade embrionária e comparam diferentes fontes de produção de embriões.

Existe uma correspondência entre o nível de transcritos relacionados a apoptose e a qualidade de embriões produzidos *in vitro* (Badr et al., 2007).

Lonergan et al., 2003 constataram que embriões de PIV apresentam transcritos apoptóticos a partir de estágio de 8 células, enquanto os embriões *in vivo* apresentam a partir de 16 células. Rizos et al. 2003, concluíram que a expressão aumentada de BAX reflete a menor qualidade de embriões cultivados sob condições subótimas.

A expressão do gene BAX foi significativamente maior em ovócitos de baixa qualidade, ovócitos desnudos e embriões fragmentados, enquanto o anti-apoptótico BCL-2 teve uma expressão gênica maior em ovócitos e embriões de boa qualidade, sugerindo a interação e a razão do BAX e BCL-2 como a responsável pela susceptibilidade à processos apoptóticos e pela tendência da sobrevivência ou morte e conseqüentemente uma competência desenvolvimental diferente (Yang & Rajamahendran, 2002). O BCL-2 é considerado um anti-apoptótico, que previne a apoptose, mantendo a sobrevivência da célula através da liberação do citocromo c da mitocôndria, através da alteração da proliferação (Badr et al., 2007).

Entretanto, Vandaele et al, 2008, não observaram diferenças na expressão do mRNA de BAX, BCL-2, Caspase -3 e Caspase-7 em embriões tratados com um reagente indutor de

apoptose, em comparação com embriões não tratados, ambos produzidos *in vitro*, concluindo que a expressão do mRNA do BAX, BCL-2, Caspase -3 e Caspase-7 não podem ser usados como método confiável de detecção de apoptose em embriões individuais. Segundo o mesmo autor, esses achados podem ter sido parcialmente causados pelos níveis muito baixos (próximos do limite de detecção) e pela ampla variação dentro dos grupos.

## **2.6 Reconhecimento da gestação, viabilidade e competência embrionária e o gene INF- $\tau$**

Entende-se por placentação a forma como as membranas associadas ao embrião ou feto se desenvolvem e se ligam ao endométrio, e associada à placentação desenvolve-se a implantação embrionária, processos determinantes no estabelecimento da comunicação materno-embrionária em cada espécie (Marques et al., 2007).

A implantação do embrião é um processo gradual que se inicia próximo ao seu local de contato com o útero e estende-se periféricamente (Hafez & Hafez, 2004). É um processo requerido para sustentar a nutrição e a proteção do concepto durante a gestação.

A manutenção precoce da gestação depende da sincronia entre a produção de mensagens bioquímicas que é estabelecida entre o concepto e o tecido endometrial. É justamente esse “diálogo” bioquímico, no qual o concepto sinaliza a unidade materna sua presença prolongando a vida do corpo lúteo que proporciona o reconhecimento materno da gestação e a mantém (Marques et al., 2007).

Existem proteínas específicas, secretadas pelo trofoblasto embrionário, que são mediadoras desse reconhecimento. Esse grupo de polipeptídeos era chamado inicialmente de complexo de proteínas trofoblásticas bovino (complexo bTP-1), e era sintetizado pelo tecido do

concepto. Hoje já se sabe que o complexo bTP-1 tem como o principal representante o Interferon-tau (INTERFERON- $\tau$ ) (Gonçalves, 2008).

No início da gestação os embriões devem inibir o mecanismo de luteólise para manter a secreção de progesterona necessária à manutenção da prenhez. O sucesso do reconhecimento da gestação depende da presença, em quantidade suficiente, de INTERFERON- $\tau$  produzido pelo embrião, o que irá inibir a produção de prostaglandina (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) pelo endométrio e manterá os níveis de progesterona. O INTERFERON- $\tau$  causa o reconhecimento da prenhez após a fecundação, mas o mecanismo pelo qual ele inibe a PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  e mantém os níveis de progesterona ainda não foi totalmente esclarecido (Roberts, 2008).

Neira et al. (2007) observaram que embriões de qualidade excelente ou boa tiveram maior produção de IFN- $\tau$  comparados aos embriões de pior qualidade, mostrando que a produção do IFN- $\tau$  pode ser um indicador de qualidade embrionária

O reconhecimento da gestação é considerado um dos maiores desafios biológicos para a obtenção de índices reprodutivos satisfatórios em bovinos. Dessa forma, o INTERFERON- $\tau$ , tem sido considerado um marcador de qualidade embrionária (Rizos *et al.*; 2003 e Rizos *et al.*; 2004).

### 3. OBJETIVOS

Verificar diferenças na expressão gênica dos genes associados com o desenvolvimento embrionário bovino (IGF-II, IGF-IIR, GRB-10), estresse oxidativo (CATALASE, MnSOD, GPX-4), apoptose (BAX) e qualidade embrionária (INTERFERON- $\tau$ ) e compará-las em embriões produzidos em 3 diferentes sistemas: produzidos *in vivo* (OVN) através de ovulação natural (sem nenhum estímulo hormonal), *in vitro* (PIV) e embriões produzidos por superovulação (SOV).

#### 4. HIPÓTESE

Há diferenças na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário bovino, entre embriões produzidos *in vivo* por ovulação natural (OVN), sem estímulos exógenos, por superovulação (SOV) e por produção *in vitro* (PIV).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badr H, Bongioni G, Abdoon AS, Kandil O, Puglisi R.. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote*. Nov;15(4): 355-367, 2007.
- Baumann, CG, Morris, DG, Sreenan, JM e Leese, HJ. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Mol. Reprod. Dev.*. 74:1345-1353, 2007.
- Bertolini M, Beam SW, Shim H, Bertolini LR, Moyer AL, Famula TR, Anderson GB. Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Mol Reprod Dev.* 2002 Nov;63(3):318-28.
- Byrne AT, Southgate J, Brison DR and Leese H. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *Journal of Reproduction and Fertility.* 117, 97-105, 1999.
- Coelho, H.E. (1997). *Patologia Geral Veterinária*. 2 edição. Uberlândia: Impresso.
- Corrêa, GA, Rumpf, R, Mundim, TC, Franco, MM e Dode MA. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Animal Reproduction Science.* 104(2-4):132-142, 2008.
- Dufresne, A.M., Smith, R.J. The adapter protein GRB-10 is an endogenous negative regulator of insulin-like growth factor signaling. *Endocrinology*, 146 (10): 4399-4409, 2005.
- Fairburn HR, Young LE and Hendrich BD. Epigenetic reprogramming: how now, cloned cow? *Current Biology* 12:R68-R70, 2002.
- Fortier, A.L., Lopes, L.F., Darricarrère, N., Martel, J., Trasler, J.M. Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta. *Human molecular genetics.* 17: 1653-1665, 2008.

- Gonçalves, Paulo Bayard Dias; Figueiredo, José Ricardo; Freitas, Vicente José de Figueiredo. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. 2 ed., São Paulo, Roca, 2008.
- Goodall, J.J.; Schmutz, S.M. Linkage mapping of IGF2 on cattle chromosome 29. *Anim. Genet.*v.34, p.313, 2003.
- Guérin, P.; Mouatassim, S. El and Ménézo, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pré-implantation embryo and its surroundings. *Human Reprod. Update.* V. 07, n° 2, p. 175-189, 2001.
- Hafez, B.; Hafez, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7.ed. Barueri: Manole, 2004, 513p.
- Hardy K. Apoptosis in the human embryo. *Reviews of Reproduction.* 4, 125-134, 1999.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD and Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:9821-9826, 1996.
- Hunter, P. The silence of genes. *European molecular biology organization.* Vol. 8, n° 5, p. 441-443, 2007.
- Isles, A.R. & Holland, A.J. imprinted genes and mother-offspring interactions. *Early human development.* 81, 73-77, 2005.
- Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W and Feil R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biology of reproduction* 64:918-926, 2001.
- Lee, J., Inoue; K., Ono, R.; Ogonuki, N.; Kohda, T.; Kaneko-Ishino, T.; Ogura, A. e Ishino, F. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development,* c.129, p.1807- 1817, 2002.

- Li, E., Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews*, 3, 662-673, 2002.
- Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D., Evans, A. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* , Volume 65, Issue 1 , Pages 137 – 152, 2006.
- Marques, V.B., Bertan, C.M., Almeida, A.B., Meirelles, F.V., Papa, P.C., Binelli, M. Interferon-tau e o reconhecimento da gestação em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.31, n.4, p.479-488, 2007.
- Mayer, W.; Niveleau, A.; Walter, J.; Fundele, R.; Haaf, T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*. Vol. 403, p. 501-502, 2000.
- 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. *Animal Reproduction Science* 82–83, 13–20, 2004.
- Moore, T. Genetic conflict, genomic imprinting and establishment of the epigenotype in relation to growth. *Reproduction*, v.122, p.185-193, 2001.
- Murphy, S.K.; Jirtle, R.L. Imprinting evolution and the price of silence. *BioEssays*, v. 25, p.577-588, 2003.
- Natale DR, Sousa PA, Westhusin ME and Watson AJ. Sensitivity of bovine blastocyst gene expression patterns to culture environments assessed by differential display RT-PCR. *Reproduction* 122(5):687-693, 2001.

- Neira JA, Tainturier D, L'Haridon RM, Martal J. Comparative IFN-tau secretion after hatching by bovine blastocysts derived ex vivo and completely produced in vitro. *Reproduction of Domestic Animals*. 2007 Feb;42(1):68-75.
- Niemann and Wrenzychi C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*. 53, 21-34, 2000.
- Ramos, F. J.; Langlais, P. R.; Hu, D.; Dong, L. Q.; Liu, F. Grb10 mediates insulin-stimulated degradation of the insulin receptor: a mechanism of negative regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, p.E1262-E1266, 2006.
- Reik, W., Dean, W., Walter, J. Epigenetic Reprogramming in mammalian development. *Science*, 293, 1089-1093, 2001.
- Rivera, R.M., Stein, P., Weaver, J.R., Mager, J., Schultz, M., Bartolomei, M.S. Manipulation of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Human molecular genetics*. 17:1-14, 2008.
- Rizos, D.; Gutierrez-Adan, A.; Pérez-Garnelo, S. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, criotolerance and meseenger RNA expression. *Biol. Reprod.* V.68, p. 236-243, 2003.
- Rizos, Gutierrez-adan, A.; Moreira, P. Species –related differences in blastocyst quality are associated with differences in relative mRNA transcription. *Molecular Reproduction Development*. V. 69, p. 381-386, 2004.
- Roberts, R.M., Chen, Y., Toshihiko, E., Walker, A.M. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19,170- 177, 2008.

- Ruddock, T. N.; 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. *Biology of Reproduction* 70, p.1131-1135, 2004.
- Swales, A.K.E. & Spears, N. Genomic Imprinting and Reproduction. Review. *Reproduction* - 2005, on line version via [www.reproduction-online.org](http://www.reproduction-online.org)
- Vandaele, L., Goossens, K., Peelman, A., mRNA expression of Bcl-2, Bax, caspases-3 and 7, cannot be used as a marker for apoptosis in bovine blastocysts. *Animal Reproduction Science* 106, 168-173; 2008.
- Wang, L., Balas, B., Christ-Roberts, C.Y., Kim, R.Y., Ramos, F.J., Kikani, C.K., Li, C., Deng, C., Reyna, S., Musi, N., Dong, L.Q., DeFronzo, R.A., Liu, F. Peripheral disruption of the GRB-10 gene enhances insulin signaling and sensitivity in vivo. *Molecular and cellular biology*, vol. 27, N°18, p. 6497-6505, 2007.
- Waterland, R.A. and Michels, K.B. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *The annual review of nutrition*. Vol. 27, p. 363-388, 2007.
- Wilkins, J.F. & Haig, D. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nature Reviews* 4:1-10, 2003.
- Yang, M.Y., Rajamahendran, R. 2002. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Animal Reproduction Science*. 70, 159- 169.

## **CAPÍTULO ÚNICO**

**EMBRIÃO PRODUZIDO POR HIPERESTIMULAÇÃO HORMONAL É UM  
CONTROLE ADEQUADO PARA O ESTUDO DE PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA  
EM EMBRIÕES PIV?**

**EMBRIÃO PRODUZIDO POR HIPERESTIMULAÇÃO HORMONAL É UM  
CONTROLE ADEQUADO PARA O ESTUDO DE PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA  
EM EMBRIÕES PIV?**

**RESUMO**

Embriões produzidos por hiperestimulação hormonal são usados como controle *in vivo* na maioria das publicações relacionadas à expressão gênica. Entretanto, ainda não se sabe se esses embriões são os controles mais apropriados a serem utilizados em estudos de perfil da expressão gênica. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi comparar a expressão dos genes candidatos relacionados ao desenvolvimento embrionário bovino: GRB-10, IGF-II, IGF-IIR, MnSOD, GPX-4, CATALASE, BAX, e INTERFERON- $\tau$ , entre embriões produzidos *in vivo* através de superovulação (SOV), através de Produção *in vitro* (PIV) e *in vivo* produzidos por ovulação natural, sem nenhuma estimulação hormonal (OVN). A comparação foi realizada através da técnica de RT-PCR usando  $\beta$ -ACTIN e GAPDH como os controles constitutivos. Quando a expressão individual dos genes foi analisada, GRB-10 foi menos expresso em embriões OVN do que em SOV ( $P = 0.04$ ) e PIV ( $P = 0.01$ ), no entanto, nenhuma diferença foi encontrada entre os outros genes. Genes relacionados à resposta ao estresse foram agrupados e comparados entre os diferentes tipos de embriões. A soma da expressão dos genes MnSOD, GPX-4, CATALASE tende ( $P = 0.10$ ) a ser maior em embriões PIV do que em OVN. A expressão de todos os genes estudados foi também somadas para cada tratamento, e a expressão gênica geral foi menor em embriões OVN quando comparados com embriões de SOV ( $P = 0.06$ ) ou de PIV ( $P = 0.04$ ). Nenhuma diferença foi observada entre os embriões SOV e PIV ( $P = 0.70$ ). Finalmente, os genes foram agrupados de acordo com suas funções, relacionadas ao

desenvolvimento embrionário (GRB-10, IGF-II e IGF-IIR), a resposta ao estresse (MnSOD, GPX-4 e CATALASE) e a qualidade embrionária (Bax, INTERFERON- $\tau$ ). A análise de correlação foi realizada e mostrou um comportamento distinto nos embriões de OVN quando comparados com os de SOV ( $r = -0,9429$ ) e com os de PIV ( $r = -0,8833$ ) para os genes GRB-10, IGF-II e IGF-IIR. No entanto, o comportamento desses genes foi similar para os embriões de SOV e de PIV ( $r = 0,9890$ ). Concluímos que a estimulação hormonal ovariana afeta os embriões através da alteração de sua expressão gênica. Portanto, se os embriões de SOV tiverem que ser usados como controle em estudos de expressão gênica, os dados deverão ser analisados com cautela.

**Palavras-chave:** Embriões, Bovino, Expressão Gênica e ARTs.

**IS THE EMBRYO PRODUCED BY HORMONAL HYPERSTIMULATION AN  
APPROPRIATE CONTROL FOR THE STUDY OF GENE EXPRESSION PROFILES  
OF IVP EMBRYOS?**

**ABSTRACT**

Embryos produced by hormonal hyperstimulation are used as “*in vivo*” control in the majority of publications related to gene expression. However, if those are the most appropriated control for gene expression profile studies it is not known. Thus, the objective of this study was to compare the expression of GRB-10, IGF-II, IGF-IIR, MnSOD, GPX-4, Catalase, BAX, and INTERFERON- $\tau$  genes among embryos produced *in vivo* by hormonal hyperstimulation (SOV), by in vitro fertilization (IVF) or *in vivo* without any hormonal stimulus (NOV). Comparison was performed using a semi-quantitative RT-PCR using  $\beta$ -ACTIN and GAPDH as constitutive controls. When the individual gene expression was analyzed, GRB-10 was less expressed in NOV than SOV ( $P = 0.04$ ) and IVF ( $P = 0.01$ ) embryos, whereas no differences were found for the other genes. Then, genes related to stress response were grouped and compared among the types of embryos. The sum of expression of MnSOD, GPX-4, CATALASE genes tended ( $P = 0.10$ ) to be greater in IVF than NOV embryos. The expression of all studied genes were also added together for each treatment, the “overall” gene expression was lower in the NOV embryos when compared with SOV ( $P = 0.06$ ) or IVF ( $P = 0.04$ ). No difference was observed between the SOV and IVF embryos ( $P = 0.70$ ). Finally, genes were grouped according to their function as being related to embryo development (GRB-10, IGF-II, IGF-IIR), stress response (MnSOD, GPX4, CATALASE) and embryo quality (BAX, INT $\tau$ ). A correlation analysis was performed and showed a distinct behavior for NOV embryos when compared with SOV ( $r = -0.9429$ ) or

IVF ( $r = -0.8833$ ) for GRB-10, IGF-II and IGF-IIR genes. However, the behavior of those genes was similar for SOV and IVF embryos ( $r = 0.9890$ ). We conclude that ovarian hormonal stimulation affects embryos by altering their gene expression. Therefore, if SOV embryos have to be used as experimental control for gene expression studies, data should be analyzed with caution.

**Key words:** Embryos, Bovine, Gene Expression, ARTs

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de várias tecnologias de reprodução assistida (ARTs) como: inseminação artificial (IA), superovulação (SOV), transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIV) têm contribuído para programas de melhoramento animal e disseminação de raças em risco de extinção. Estas tecnologias permitem, de forma mais rápida, a introgressão de alelos desejáveis nas populações animais, aumentando o melhoramento genético em um curto período de tempo (Meuwissen, 1998). Além disso, a clonagem animal e a transgênese podem contribuir enormemente, em um futuro próximo, para a indústria farmacêutica entre muitas outras aplicações (Melo et al., 2007).

Embora, na última década, tenha sido alcançado um progresso substancial nas ARTs, a eficiência global de algumas dessas técnicas estão ainda abaixo do nível esperado. Muitos fatores podem afetar a eficiência das ARTs, tanto em humanos quanto em animais. Na TE, por exemplo, a variabilidade na resposta a hiperestimulação hormonal, o estado nutricional, bem como o sincronismo entre o desenvolvimento do embrião transferido e a fêmea receptora são considerados os fatores mais importantes (Spearow & Barkley 1999a; Spearow et al. 1999b; Mayorga et al., 2000; Simoni et al., 2002; de Castro et al., 2003; de Castro et al., 2004; Santos et al., 2008). Em relação à PIV, o cultivo *in vitro* de ovócitos e embriões, a composição dos meios, bem como as condições ambientais, podem ter um profundo efeito sobre o resultado final (Gardner & Lane, 2005). Na clonagem animal, além dos fatores mencionados anteriormente, a capacidade do citoplasma do ovócito realizar uma correta reprogramação nuclear é fundamental para o seu sucesso (Smith et al., 2005; Sasaki & Matsui, 2008).

Atualmente, os parâmetros utilizados para avaliar a eficiência da PIV são: taxa de clivagem, taxa de blastocistos e o aspecto morfológico dos embriões no momento da transferência. Embora esses parâmetros forneçam uma indicação da qualidade do embrião, eles não refletem a sua total normalidade, uma vez que a taxa de gestação desses embriões raramente excede 50%. Assim, existe uma necessidade de estabelecer outras estratégias para analisar mais objetivamente o potencial de desenvolvimento dos embriões PIV. Neste sentido, a avaliação dos parâmetros moleculares têm se tornado fundamental para compreender os processos bioquímicos envolvidos no desenvolvimento de embriões saudáveis. Esses parâmetros serão críticos para o desenvolvimento de meios de cultura que possam atender as exigências do embrião e também melhorar os protocolos da PIV (Niemann & Wrenzycki, 2000).

A maioria das publicações atuais considera os embriões produzidos por hiperestimulação hormonal como os tradicionais controle *in vivo*, mas esses embriões podem diferir, substancialmente, dos embriões produzidos de forma natural e podem não ser um controle apropriado para estudos de perfil de expressão gênica. De fato, vários estudos têm relatado a influência da hiperestimulação hormonal na expressão de genes imprinted na placenta (Fortier et al., 2008) e na qualidade do embrião (Rossignol et al., 2006; Fauque et al., 2007; Sato et al., 2007). Portanto, por muitas razões, a qualidade e o metabolismo do embrião produzido através de diferentes ARTs podem ser muito distintas.

O objetivo desse estudo foi comparar o perfil de expressão de alguns genes candidatos envolvidos com o desenvolvimento embrionário, estresse oxidativo e qualidade embrionária entre embriões produzidos *in vivo* por superovulação, produzidos através da fecundação *in vitro* e produzidos *in vivo* sem qualquer estímulo hormonal.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Quarenta e uma novilhas cíclicas, F1,  $\frac{1}{2}$  sangue Simental X  $\frac{1}{2}$  sangue Nelore e dois touros Curraleiros foram utilizados no experimento. As novilhas tinham de 2 a 3 anos e os touros 7 anos. Todos os animais foram mantidos em pastagem (*Brachiaria brizantha*), com livre acesso à água e suplementação mineral, no Centro Experimental Sucupira da Embrapa- Recursos Genéticos e Biotecnologia – Distrito Federal- Brasil.

Esses animais foram submetidos a 3 diferentes tratamentos: produção de embriões *in vivo* através da ovulação natural, sem nenhum estímulo hormonal (OVN), produção *in vivo* através da superovulação (SOV) e produção *in vitro* (PIV). A coleta do material a ser analisado, de todos os tratamentos, foi realizada no período de maio a dezembro de 2005. Para todos os tratamentos foram formados 3 pools de 15 embriões cada (6 mórulas e 9 blastocistos). Após a colheita, os embriões foram lavados duas vezes com PBS sem soro, transferidos para tubos estéreis devidamente identificados, contendo o reagente Trizol (100 $\mu$ l) e foram imediatamente congelados a -80°C.

Ao final da colheita, os tubos contendo os embriões foram enviados ao laboratório de reprodução animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, onde foram procedidas as extrações de RNA e análises de expressão gênica. Foram comparados entre os tratamentos a expressão dos genes: IGF-II, IGF-IIR, GRB-10, MnSOD, GPX-4, CATALASE, BAX e INTERFERON- $\tau$ . Os genes  $\beta$ -ACTIN e GAPDH foram usados como controles constitutivos.

## 2.2 Produção e coleta dos embriões

### Produção de embriões através da ovulação natural (OVN), sem estímulo hormonal exógeno

As novilhas foram observadas durante uma hora, duas vezes por dia, durante 12 horas de intervalo, com a finalidade de detectar o estro natural (não induzido). As novilhas, em que o estro foi detectado, foram acasaladas com um dos touros. Sete dias após a detecção do estro, embriões foram coletados através de lavagem uterina com D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) e apenas os embriões classificados como grau I ou II, segundo a classificação da IETS (Manual of the IETS, 1998), foram selecionados. Após a colheita, as novilhas foram tratadas com 0.150mg IM de cloprostenol (Prolise, ARSA S.L.R., Argentina) para evitar a gestação em caso de falhas na recuperação do embrião. O estro induzido não foi usado para o acasalamento. No próximo estro espontâneo, as novilhas foram usadas novamente, num total de não mais de três vezes para cada novilha.

### Produção de embriões através de superovulação (SOV)

Os mesmos animais usados para produzir os embriões OVN foram hormonalmente estimulados (superovulados) de acordo com o seguinte protocolo:

Tabela 1: Protocolo utilizado para a superestimulação hormonal dos animais

<b>Dia</b>	<b>Procedimento</b>
D0	Colocação de um implante intravaginal contendo progesterona (DIB, Syntex S.A., Argentina)  Injeção de 2.0 mg de benzoato de estradiol (Ric-Be, Syntex S.A.)
D4 – D7	Superestimulação com 8 injeções de FSH (Pluset, 250 IU, Calier, Barcelona, Espanha)

---

D6	Injeção de 0.150 mg IM de cloprostenol (Prolise)
D6.5	Remoção do implante intravaginal
D8.5 e D9	Inseminação artificial
D15	Colheita de embriões

---

As novilhas foram artificialmente inseminadas com um pool de sêmen congelado / descongelado dos mesmos touros utilizados para a produção dos embriões OVN. A coleta e seleção dos embriões foram processadas como descrito anteriormente e as novilhas que foram superovuladas não foram usadas novamente no experimento, devido ao possível efeito residual do FSH.

A colheita dos embriões foi realizada utilizando-se a técnica descrita por Mollo et al. (2006).

### **Produção de embriões *in vitro* (PIV)**

As novilhas que não foram submetidas a superovulação e após o término do protocolo de OVN, foram submetidas à técnica de aspiração folicular transvaginal, na qual todos os folículos maiores que 3mm foram aspirados para a recuperação dos complexos *cumulus* ovócitos (CCOs). Quatro dias antes da aspiração folicular transvaginal todos os folículos maiores que 5mm foram ablacionados, por aspiração transvaginal, com a finalidade de sincronizar a emergência da onda folicular. Os CCOs que apresentavam citoplasma homogêneo e com pelo menos três camadas de células do *cumulus* foram selecionados, maturados, fecundados e cultivados *in vitro*.

### Aspiração Folicular Transvaginal:

Um aparelho de ultrason (Aloka SSD – 500, Japão) equipado com um transdutor setorial de 5 MHz (Aloka USD994T-5, Japão) associado a um sistema com agulha longa foi utilizado para realizar a OPU. Previamente às aspirações foliculares, foi realizada uma anestesia epidural caudal com 3mL de lidocaína 2% (Pearson, Eurofarma, Brasil). Durante as sessões de aspirações, todos os folículos maiores que 3mm de diâmetro foram posicionados abaixo da linha de punção e aspirados com uma agulha de um cateter 16G (Jelco, Johnson & Johnson company, Belgium) conectado através do sistema de punção (Handle Cook) a um tubo de 50 mL (Falcon 2074), onde o líquido folicular foi armazenado. O líquido folicular foi aspirado usando uma pressão negativa constante de 80mmHg, com uma taxa equivalente a 13ml/min, com o auxílio de uma bomba de vácuo (Cook VMAR – 5100). Antes e depois da aspiração folicular, o sistema de agulha foi lavado com meio de punção com D-PBS, 1% de soro fetal bovino (Gibco) e 5 UI/mL de heparina (Liquemine, Roche, Brasil).

### *Avaliação dos ovócitos e produção dos embriões in vitro:*

Os COCs depois de aspirados foram transportados para o laboratório e lavados com PBS, e filtrados através de um filtro de 75µm. O material retido foi transferido para uma placa de Petri e examinado com o auxílio de um estereomicroscópio (Zeiss – Stemi SV6, Germany) para procurar os CCOs. CCOs foram avaliados quanto a qualidade de acordo com a morfologia, segundo a classificação da IETS. Oócitos viáveis (graus I e II) foram selecionados para a PIV. Para a maturação, os ovócitos foram colocados, individualmente por vaca, em gotas de 200µl de meio de maturação (TCM-199 (Invitrogen, CA, USA) suplementado com LH, FSH, antibióticos e 10% FCS (Invitrogen, CA, USA)) cobertos com óleo mineral e incubados por 22-26 h à 39°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os ovócitos maturados foram inseminados com sêmen congelado / descongelado dos

mesmos touros usados nos outros grupos experimentais, numa concentração total de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Após 18 horas de co-incubação foram lavados e transferidos para o meio SOFaaci (Holm et al., 1999), suplementado com 2.77mM de myo-inositol e 5% de FCS. Os embriões foram cultivados por 7 dias e somente os de graus I e II foram utilizados.

### **2.3 Extração de RNA**

A extração de RNA total dos 9 pools de embriões, no estágio de blastocisto D7, foram desenvolvidas a partir do método fenol-clorofórmio, utilizando-se o reagent Trizol (Invitrogen, CA, USA), seguindo os seguintes passos: os tubos contendo os embriões e o Trizol (100 $\mu$ l) foram agitados rapidamente e deixados a temperatura ambiente por 5 minutos. Foi adicionado glicogênio (25 $\mu$ g; Invitrogen, CA, USA) e Clorofórmio 20 $\mu$ l (Merck). As amostras foram vigorosamente agitadas e incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos, centrifugadas a 12000g por 15 Minutos a 4°C. A fase superior, aquosa, foi removida e foi adicionado isopropanol gelado 50 $\mu$ l (Mallinckrodt). O RNA foi deixado precipitando por 16 horas no freezer -20°C, seguido por uma centrifugação a 13000 g por 7 minutos a 4°C. Os pellets de RNA foram lavados com 100 $\mu$ l de etanol 75% (Mallinckrodt), secos ao ar, e ressuspensos em 8 $\mu$ l de água estéril. Possíveis contaminações com DNA genômico foram removidas pelo tratamento do RNA com 1 unidade de DNase (Promega), 1  $\mu$ l de tampão da Dnase for 30 min - 37°C. A Dnase foi inativada pela adição de 1 $\mu$ l de stop solution (Promega) por 10 min - 65°C. Imediatamente depois, foi realizada a transcrição reversa.

## **2.4 Transcrição Reversa**

O RNA total de cada pool foi convertido em DNA complementar (cDNA) através da transcrição reversa (RT), utilizando-se primers 0,5µg oligo(dT) 20 (Invitrogen, CA, USA), 200 µM de cada dNTP (Invitrogen, CA, USA), 1X tampão da RT, 2 µl DTT 0.1 M, 40 IU RNase inibitor (Invitrogen, CA, USA), e 200 UI de SuperScript III (Invitrogen, CA, USA). A reação foi realizada a 42°C por 52 minutos, seguida por uma inativação a 70°C por 15 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento de sua utilização.

## **2.5 PCR semi-quantitativo**

A amplificação dos genes ( $\beta$ -Actina, GAPDH, IGF-II, IGF-IIR, GRB-10, MnSOD, GPX-4, CATALASE, BAX e INTERFERON- $\tau$ ) foi realizada pela técnica de RT-PCR semi-quantitativo. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando o termociclador Mastercycler gradient-ependorf. As condições de amplificação empregadas na PCR foram: 2µl de cDNA (equivalente a 0.75 blastocisto), 2 UI de Taq DNA polymerase (Invitrogen CA, USA), 0.5µM de cada primer específico, 200µM de cada dNTP, 2.0mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X tampão da Taq, num volume final de 20µl. As sequências dos primers e tamanho dos produtos amplificados estão representados na tabela 2. O programa de PCR utilizado foi: 93°C por 5 minutos, seguido por 29 ciclos (GPX, Mn-SOD, INTERFERON- $\tau$ ), 32 ciclos ( $\beta$ -Actina), 31 ciclos (GAPDH), 33 ciclos (CATALASE), 35 ciclos (GRB-10), 40 ciclos (BAX, IGF-II, IGF-IIR) a 93°C por 40 s, 54°C por 40 s, e 72°C por 1 minuto. A incubação final foi realizada a 72°C por 5 minutos. A fase exponencial da PCR foi determinada pelas mesmas condições descritas acima, testando de 20–37

ciclos para cada gene (dados não fornecidos). Como controles endógenos, para a normalização dos dados, foram utilizados 2 genes de expressão constitutiva, a  $\beta$ -ACTIN e o GAPDH.

## 2.6 Quantificação

Após a amplificação, os produtos amplificados foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo (10 mg/ml) e fotografados sob luz ultravioleta. Todos os produtos amplificados foram colocados no mesmo gel de agarose e a quantificação da expressão gênica foi realizada por densitometria usando o Software ImageJ Software versão 1.36b, National Institutes of Health, USA. A quantidade relativa de cada gene foi determinada pela razão:  $IOD_{\text{gene específico}}/IOD_{\text{média GAPDH/\beta-Actina}}$ , onde o IOD é a densidade óptica específica.

## 2.7 Estatística

Os dados obtidos da expressão gênica foram analisados pelo teste t (dados paramétricos) e pelo teste de Mann-Whitney (dados não-paramétricos) utilizando-se o Software Prophet (BBN Systems and Technologies). Três comparações foram realizadas entre as diferentes fontes de embriões. Inicialmente, a expressão quantitativa de cada gene foi analisada individualmente. Em seguida, a soma da expressão dos genes relacionados à resposta ao estresse foi usada para comparar os tratamentos experimentais. Por fim, uma expressão "global", representada pela somatória da expressão de todos os genes estudados, foi avaliada em todos os tratamentos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão.

Para avaliar o perfil dos grupos de genes em cada fonte de embriões (OVN, SOV e PIV), os genes foram agrupados de acordo com sua função em relação à: desenvolvimento embrionário

(GRB-10, IGF-II, IGF-IIR), resposta ao estresse (MnSOD, GPX4, CATALASE) e qualidade embrionária (BAX, INT- $\tau$ ). Em seguida, uma análise de correlação foi realizada utilizando o Microsoft Office Excel 2003.

Tabela 2. Sequência de Primers e tamanhos dos produtos amplificados para cada gene usado na avaliação da expressão gênica.

Gene	Sequência	Produto amplificado (bp)
IGF-II		
Sense	5'-TCGTGCTGCTATGCTGCTTACC-3'	306bp
Antisense	5'-ACTGCTTCCAGGTGTCAGATTGG-3'	
IGF-IIR		
Sense	5'-CGCCTACAGCGAGAAGGGGGTTAGTC-3'	293bp
Antisense	5'-AGAAAAGCGTGCACGTGCGCTTGTC-3'	
GRB-10		
Sense	5'-GAAGATGGGACAAGCAAAGT-3'	290bp
Antisense	5'-CTGGCACCAAGTAACCATCTG-3'	
GPX-4		
Sense	5'-CGCCGAGTGTGGTTTAC-3'	315bp
Antisense	5'-AGGTCCTTCTCTATCACCAG-3'	
MnSOD		
Sense	5'-CCCATGAAGCCTTTCTAATCCTG-3'	307bp
Antisense	5'-TTCAGAGGCGCTACTATTCCTCC-3'	
Catalase		
Sense	5'-GTTCGCTTCTCCACTGTT-3'	454bp
Antisense	5'-GGCCATAGTCAGGATCTT-3'	
BAX		
Sense	5'-TGCAGAGGATGATCGCAGCTGTG-3'	198bp
Antisense	5'-CCAATGTCCAGCCCATCATGGTC-3'	
INTERFERON- $\tau$		
Sense	5'-GCCCTGGTGCTGGTCAGCTA-3'	564bp
Antisense	5'-CATCTTAGTCAGCGAGAGTC-3'	
$\beta$ -ACTIN		
Sense	5'-TATTGCTGCGCTCGTGGT-3'	344bp
Antisense	5'-TCTTCTCACGGTTGGCCT-3'	
GAPDH		
Sense	5'-CCCATCACCATCTTCCAGG-3'	471bp
Antisense	5'-AGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'	

### 3. RESULTADOS

Neste estudo, genes relacionados ao desenvolvimento embrionário (IGF-II, IGF-IIR e GRB-10), resposta ao estresse (MnSOD, GPX-4 e Catalase) e qualidade embrionária (BAX, INT- $\tau$ ) foram analisados em embriões produzidos por diferentes ARTs. A média dos genes constitutivos  $\beta$ -Actina e GAPDH foi usada como controle endógeno para todas as normalizações do perfil relativo da expressão gênica. Quando a expressão gênica individual foi analisada, somente o gene GRB-10 mostrou-se diferente entre os tratamentos, com uma menor expressão em embriões OVN que em SOV ( $P = 0,04$ ) e em PIV ( $P = 0,01$ ) (Figura 1).

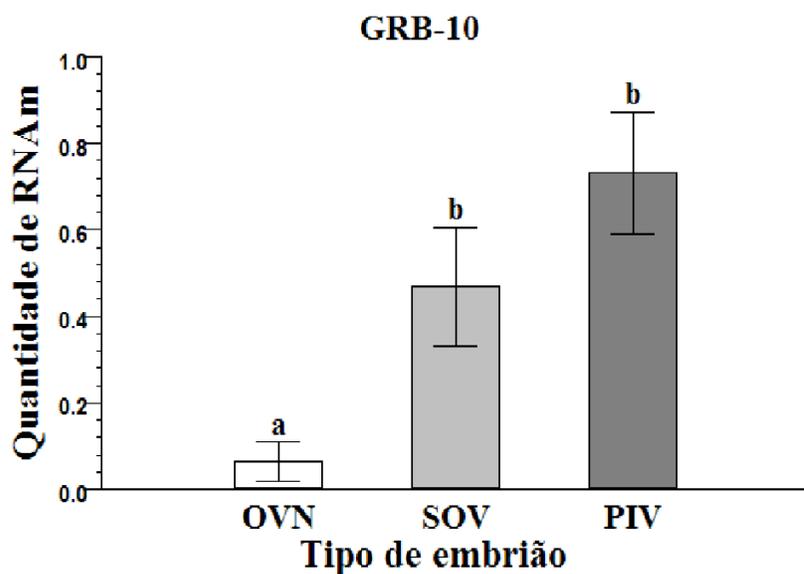


Figura 1. Quantidade relativa (média  $\pm$  erro padrão) do gene GRB-10 em embriões produzidos por diferentes sistemas: ovulação natural (OVN), superovulação (SOV) e *in vitro* (PIV). Para cada tratamento foram utilizados 3 pools de 15 em

briões. Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

Além da análise de expressão gênica individual, os perfis de IGF-II, IGF-IIR e GRB-10 foram analisados em conjunto, uma vez que participam da mesma via bioquímica (via do IGF). A análise do perfil mostrou um comportamento distinto nos embriões OVN quando comparados com os de SOV e de PIV; houve uma correlação positiva entre os perfis de expressão desses 3 genes nos embriões SOV e PIV ( $r = 0,9890$ ), porém uma correlação negativa entre embriões OVN e SOV ( $r = -0,9429$ ) ou PIV ( $r = -0,8833$ ), Figura 2.

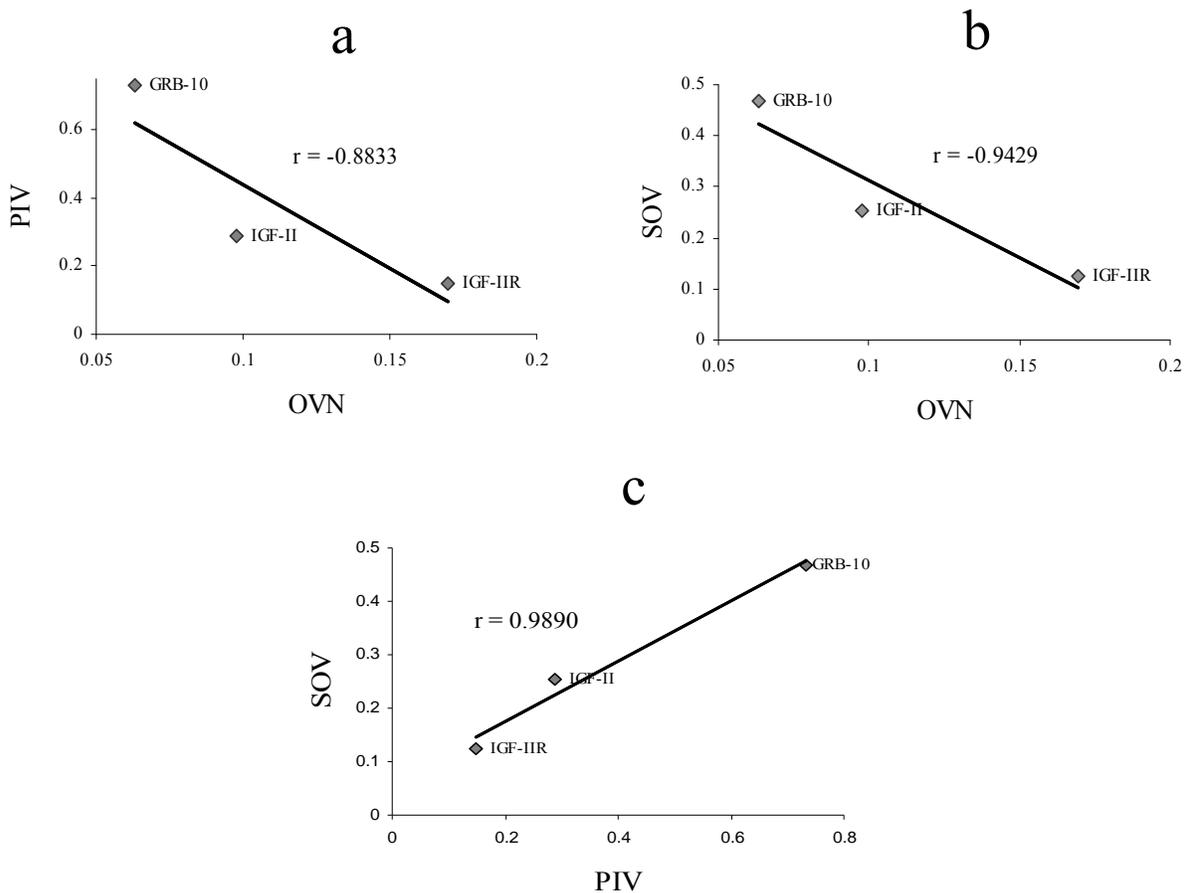


Figura 2. Análise de correlação da expressão dos genes GRB-10, IGF-II e IGF-IIR entre embriões produzidos por diferentes sistemas: ovulação natural (OVN), superovulação (SOV), e *in vitro* (PIV). a) OVN vs. PIV; b) OVN vs. SOV; c) PIV vs. SOV.

Os genes envolvidos com a resposta ao estresse (MnSOD, GPX-4 e Catalase) e os genes relacionados à qualidade embrionária (BAX e INTERFERON- $\tau$ ) foram analisados em conjunto como um grupo. Em contraste com os genes da via do IGF, o perfil de comportamento desses grupos de genes foi semelhante para os diferentes tipos de embriões (dados não mostrados). Além disso, uma vez que, genes relacionados à resposta ao estresse têm um efeito sinérgico em proteger as células contra efeitos tóxicos de radicais de oxigênio, a quantidade relativa dos genes MnSOD, GPX-4 e CATALASE foi adicionada. Em seguida, a soma foi comparada entre os grupos de tratamentos (n=9, pois foram somadas as 3 repetições de cada um dos 3 genes analisados nessa via: MnSOD, GPX-4 e CATALASE) e a expressão total para resposta ao estresse tendeu (P = 0,10) a ser maior em embriões PIV do que em OVN (Figura 3).

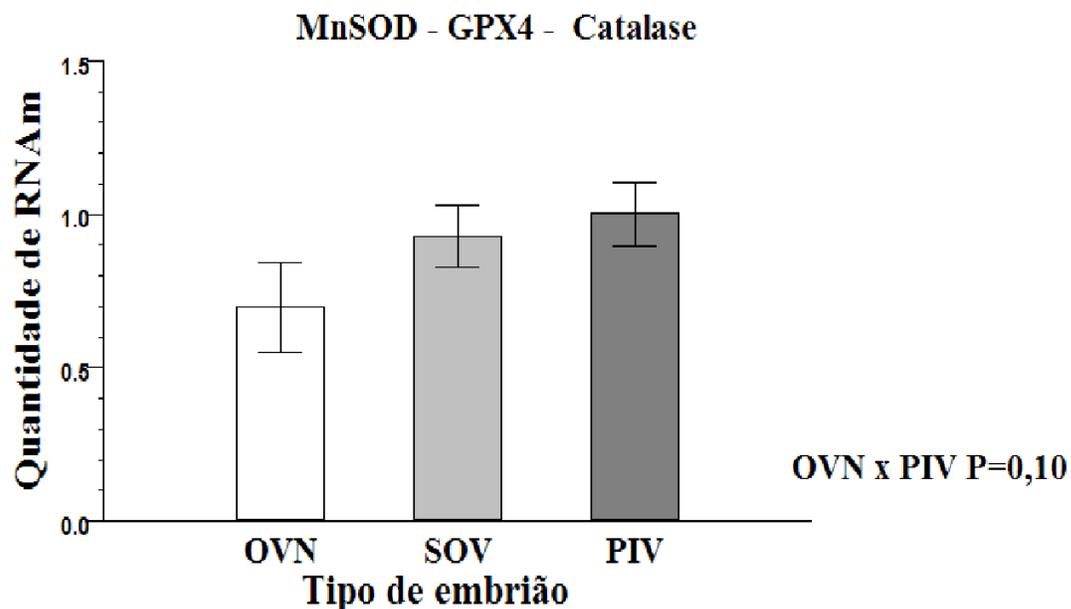


Figura 3. Soma da quantidade relativa de mRNA (média  $\pm$  erro padrão) dos genes MnSOD, GPX4 e CATALASE para cada fonte de embrião: ovulação natural (OVN), superovulação (SOV) e *in vitro* (PIV).  $n = 9$ .

Finalmente, a expressão de todos os genes analisados nesse estudo foram agrupadas em cada tratamento (OVN, SOV e PIV). Essa expressão gênica "global" foi menor em embriões OVN quando comparados com os embriões SOV ( $P = 0,06$ ) ou com embriões PIV ( $P = 0,04$ ). Nenhuma diferença foi observada entre embriões SOV e PIV ( $P = 0,70$ ), ( $n=24$ , pois foram somadas as 3 repetições de cada um dos 8 genes analisados) (Figura 4).

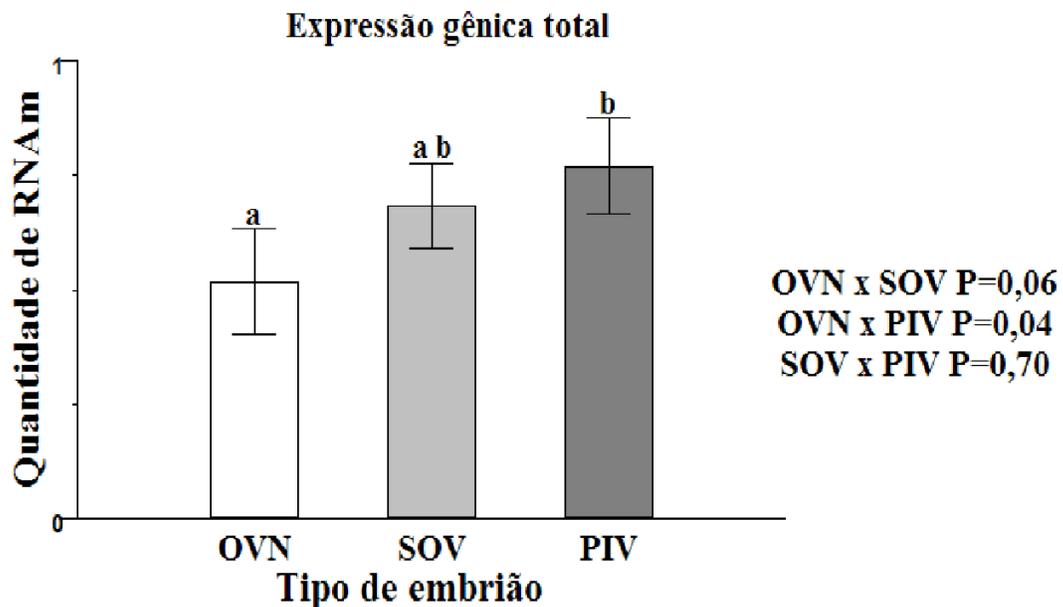


Figura 4. Soma da quantidade relativa de mRNA (média  $\pm$  erro padrão) de todos os genes em cada tratamento: ovulação natural (OVN), superovulação (SOV) e *in vitro* (PIV). Letras diferentes indicam diferenças entre grupos ( $P < 0,05$ ).  $n = 24$ .

#### 4. DISCUSSÃO

Os principais parâmetros utilizados para avaliar a eficiência dos sistemas de produção de embriões são as taxas de blastocisto e a aparência morfológica. Embora muito úteis, esses parâmetros são insuficientes para uma boa estimativa da viabilidade embrionária. Portanto, o desenvolvimento de outros métodos (mesmo os invasivos) é necessário. Estudos com expressão gênica em células e embriões estão proporcionando uma melhor compreensão de várias vias bioquímicas à um nível molecular e podem contribuir para o desenvolvimento de protocolos mais eficientes para a produção *in vitro* de embriões.

Normalmente, os estudos de expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário usam embriões produzidos com protocolos de superovulação (SOV) como os controles *in vivo* (Lequarré et al., 2001; Bertolini et al., 2002; Hall et al., 2005; Sawai et al., 2005; Lonergan et al., 2007; Moore et al., 2007; Nowak-Imialek, et al., 2008). Entretanto, estudos em camundongos e humanos têm mostrado uma diminuição na qualidade dos embriões produzidos após estimulação ovariana (Rossignol et al., 2006; Fauque et al., 2007; Sato et al., 2007), sugerindo que o tratamento hormonal pode afetar, de diferentes formas, o desenvolvimento embrionário.

Dois grandes estratégias são atualmente empregadas para estudar perfis de expressão gênica em qualquer modelo biológico: as tecnologias de microarranjos que normalmente utilizam chips de alta densidade para hibridações de cDNA, com vista na utilização de genes conhecidos e desconhecidos (Giritharan et al., 2007); ou genes candidatos, que utiliza um número definido de genes escolhidos pelas suas funções fisiológicas e bioquímicas (Lequarré et al., 2001; Bertolini et al., 2002; Han et al., 2003; Hall et al., 2005; Sawai et al., 2005; Moore et al., 2007). No presente estudo, a estratégia de genes candidatos foi escolhida e oito genes foram selecionados por seus envolvimento em algumas vias bioquímicas relevantes para o

desenvolvimento embrionário. Foram quantificadas as expressões relativas dos genes IGF-II, IGF-IIR e GRB-10, envolvidos no desenvolvimento embrionário e placentação (Moore et al., 2007); BAX e INTERFERON- $\tau$ , envolvidos na apoptose e no reconhecimento materno da gestação (Corrêa et al., 2008) e MnSOD, GPX-4 e CATALASE, relacionados com a resposta ao estresse oxidativo (Corrêa et al., 2008). Para as análises, foi utilizada a técnica de RT-PCR semi-quantitativa (Lequarré et al., 2001; Nowak-Imialek, et al., 2008; Racedo et al., 2008) com os genes  $\beta$ -ACTIN e GAPDH como os genes de referência. Embora, em certas circunstâncias, esses dois genes tenham diferentes papéis na bioquímica das células e suas expressões possam mudar, no presente estudo, eles mostraram um perfil de expressão equivalente (dados não mostrados). Acredita-se que a combinação de dois ou mais genes constitutivos dará uma melhor referência para o nível geral de expressão gênica em diferentes condições experimentais e em todas as fases de desenvolvimento. Por isso, optou-se por normalizar a expressão gênica utilizando uma média da expressão desses dois genes.

Inicialmente, a expressão individual dos genes candidatos foram avaliadas em cada grupo experimental (OVN, SOV e PIV). A expressão relativa da maioria dos genes estudados foi semelhante para os diferentes grupos de embriões, exceto o GRB-10, que mostraram uma reduzida expressão no grupo OVN (Figura 1). O GRB-10 é um membro da super família de proteínas adaptadoras que se ligam a receptores mitogênicos tirosina quinase, como a insulina e receptores IGF-I (Lim et al., 2004; Dufresne & Smith, 2005) e pode ser considerado um regulador negativo do crescimento celular e metabolismo. Lim e seus colaboradores (Lim et al., 2004) observaram que a super expressão do GRB-10 pode inibir ou estimular os sinalizadores insulina / IGF-I, dependendo do nível de expressão de suas isoformas em cada célula específica e/ou destino fisiológico. Foi demonstrado em camundongos, que o GRB-10 tem uma expressão

materna em todos os tecidos, com exceção do cérebro (Wang et al., 2007), enquanto que, o padrão de expressão paterna, em bovinos, não está bem determinado. Um super crescimento foi observado em camundongos com Knockout no GRB-10 (Charalambous et al., 2003; Wang et al., 2007) e seu imprinting foi correlacionado com algumas doenças congênitas (Charalambous et al., 2003; Lim et al., 2004). Genes imprinted, incluindo o GRB-10, foram analisados em humanos e camundongos e a maioria deles tiveram seu mRNA expressos durante o período de pré-implantação, sugerindo seu potencial papel durante o desenvolvimento inicial (Ruddock et al., 2004). A metilação do DNA é o mais conhecido marcador epigenético e está diretamente envolvido na regulação de vários genes imprinted que controlam muitas rotas durante o desenvolvimento embrionário inicial e na placentação (Fortier et al., 2008; Yamasaki-Ishizaki et al., 2007). Muitos estudos mostram a influência das manipulações *in vitro* e SOV sobre as alterações na metilação do DNA, bem como na metilação e fosforilação das histonas durante o desenvolvimento embrionário (Fortier et al., 2008; Yamasaki-Ishizaki et al., 2007). Qualquer efeito negativo sobre as marcas epigenéticas que controlam os genes imprinted pode desregular sua expressão gênica, afetando muitas funções celulares. Estes efeitos negativos são muito bem documentados em estudos com embriões clonados, onde uma reprogramação correta das células do doador é essencial para o desenvolvimento embrionário normal (Han et al., 2003; Sawai et al., 2005).

Levando em consideração todas essas informações, pode-se supor que a maior expressão de GRB-10 obtida em embriões SOV e PIV pode ser devido a mudanças epigenéticas que controlam sua expressão. Esses dados são corroborados por observações relatadas por Pantoja e colaboradores que, sob estresse celular, a expressão de GRB-10 foi alterada em fibroblastos

embrionários de camundongos (Pantoja et al., 2005). Esses autores acreditam que condições de estresse durante a proliferação celular causam alterações epigenéticas permanentes.

Além da análise individual da expressão gênica, a expressão dos genes agrupados pelas suas características funcionais foi também analisada nesse estudo e interpretou-se que o comportamento das vias bioquímicas é mais relevante que a expressão individual dos genes durante o desenvolvimento embrionário. Foi observado um comportamento similar na expressão do IGF-II, IGF-IIR e GRB-10 para os embriões de SOV e PIV (correlação positiva) que foi diferente do comportamento encontrado nos embriões de OVN (correlação negativa). ( Figura 2).

Quando os genes associados com estresse oxidativo (MnSOD, GPX-4 e CATALASE) foram analisados individualmente, nenhuma diferença na sua expressão gênica foi observada entre as diferentes fontes de embrião. Esses resultados estão em desacordo com outros estudos que mostram que a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo alteram sob diferentes sistemas de cultivo de embriões (Corrêa et al., 2008) ou com diferentes estágios de desenvolvimento embrionário (Lequarré et al., 2001). Entretanto, quando a soma da quantidade relativa de mRNA foi analisada, os embriões de PIV apresentaram uma tendência ( $P = 0,10$ ) a ter uma maior expressão desses três genes do que os embriões de OVN (Figure 3). É relatado que a cultura *in vitro* produz um meio ambiente favorável a produção de radicais livres (Corrêa et al., 2008) e isso poderia provocar uma resposta do embrião, aumentando a expressão de genes anti-oxidantes.

Em relação ao genes BAX e INTERFERON- $\tau$ , nenhuma diferença em suas expressões foi detectada, nem mesmo quando seus comportamentos foram analisados em conjunto ou individualmente. Estes resultados diferem dos dados obtidos em outros estudos que relatam diferenças em suas expressões entre embriões de SOV e de PIV (Yang & Rajamahendran, 2002;

Rizos et al., 2003). No entanto, é importante ressaltar que o uso do BAX para prever qualidade e apoptose em embriões é controversa, contrastando com resultados relatados (Vandaele et al., 2008). Os resultados contrastantes entre os estudos podem ser explicados pelas diferentes fontes de produção de embriões e diferentes sistemas usados em cada pesquisa. Avaliou-se também a expressão gênica global de cada grupo de embriões usando a soma de todos os genes estudados. Foi demonstrado que a expressão geral de mRNA foi reduzida nos embriões de OVN comparados com os de PIV ( $P = 0,04$ ) e de SOV ( $P = 0,06$ ), Figura 4. Esse resultado pode ser sustentado pela *quiet embryo hypothesis* (Leese et al., 2002; Baumann et al., 2007). Essa hipótese propõe que a viabilidade do embrião está associada a um fenótipo de metabolismo calmo, no qual os melhores embriões, no caso, *in vivo*, têm um menor volume de renovação de aminoácidos do que os embriões PIV. Esses autores defendem a hipótese de que o embrião “quiet” gastaria menos energia para fazer a reparação do DNA e RNA, e portanto, otimizar a utilização dos nutrientes. Acredita-se que qualquer estímulo que induza uma resposta celular pode aumentar a taxa global de transcrição e não necessariamente só para genes específicos. Assim, pode-se especular que os embriões produzidos por SOV e PIV, diferentemente dos de OVN provêm de um estresse e/ou de condições não otimizadas que os força a aumentar o nível de transcrição para se protegerem de um ambiente agressivo. Esse resultado, juntamente com todos os outros anteriormente apresentados nesse trabalho, reforçam a evidência de que os embriões de OVN são distintos, pelo menos bioquimicamente, dos embriões de SOV e PIV.

Esse trabalho demonstrou, pela primeira vez em bovinos, as diferenças em termos de expressão gênica, entre embriões produzidos após OVN, sem qualquer manipulação hormonal, e embriões produzidos *in vitro* e por SOV. Em humanos e camundongos, vários efeitos indesejáveis das ARTs já foram relatados, sugerindo que a superestimulação hormonal pode

levar a produção de ovócitos com imprinting incorreto e evidenciar a necessidade de mais estudos com as ARTs (Sato et al., 2007).

## 5. CONCLUSÃO

Embriões produzidos por superovulação são diferentes dos produzidos por ovulação natural e podem não são adequados para serem utilizados como controles em estudos de perfil de expressão gênica. No entanto, nos casos em que embriões de superovulação forem utilizados como controles experimentais, os dados devem ser analisados com cautela. Os resultados aqui apresentados podem ser uma fonte de informação útil para os estudos de ARTs em humanos, mostrando a sua preocupação com os possíveis efeitos colaterais dos tratamentos hormonais ou das manipulações de embriões *in vitro*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baumann, CG, Morris, DG, Sreenan, JM and Leese, HJ. (2007). The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Mol. Reprod. Dev.* 74:1345-1353.
- Bertolini, M, Beam, SW, Shim, H, Bertolini, LR, Moyer, AL, Famula, TR and Anderson GB. (2002). Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Mol Reprod Dev.* 63(3):318-328.
- Charalambous, M, Smith, FM, Bennett, WR, Crew, TE, Mackenzie, F and Ward, A. (2003). Disruption of the imprinted Grb10 gene leads to disproportionate overgrowth by an Igf2-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 8;100(14):8292-8297.
- Corrêa, GA, Rumpf, R, Mundim, TC, Franco, MM and Dode MA. (2008). Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.* 104(2-4):132-142.
- de Castro F, Moron FJ, Montoro L, Galan JJ, Hernandez DP, Padilla ES, Ramirez-Lorca R, Real LM, Ruiz A. (2004). Human controlled ovarian hyperstimulation outcome is a polygenic trait. *Pharmacogenetics.* 14(5):285-293.
- de Castro F, Ruíz R, Montoro L, Pérez-Hermández D, Padilla ESC, Real LM, Ruiz A. (2003). Role of follicle-stimulating hormone receptor ser680asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertil. and Steril.* 80(3):571-576.
- Dufresne, AM and Smith, RJ. (2005). The adapter protein GRB10 is an endogenous negative regulator of insulin-like growth factor signaling. *Endocrinology.* 146(10):4399-409.
- Fauque, P, Jouannet, P, Lesaffre, C, Ripoché, MA, Dandolo, L, Vaiman, D and Jammes H. (2007). Assisted Reproductive Technology affects developmental kinetics, H19 Imprinting

Control Region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Dev Biol.* 7:116.

Fortier, AL, Lopes, FL, Darricarrère, N, Martel, J and Trasler JM. (2008). Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta. *Hum. Mol. Genet.* 17(11):1653-1665.

Gardner, DK, and Lane, M. (2005). Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reprod., Fertil. Dev.* 17:361-370.

Giritharan, G, Talbi, S, Donjacour, A, Di Sebastiano, F, Dobson, AT and Rinaudo PF. (2007). Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. *Reproduction.* 134(1):63-72.

Hall, VJ, Ruddock, NT and French AJ. (2005). Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine in vivo, in vitro, and nuclear transfer blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 72(1):16-24.

Han, DW, Song, SJ, Uhum, SJ, Do, JT, Kim, NH, Chung, KS and Lee HT. (2003). Expression of IGF2 and IGF receptor mRNA in bovine nuclear transferred embryos. *Zygote.* 11(3):245-252.

Holm, P, Booth, PJ, Schmidt, MH, Greve, T and Callesen H. (1999). High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology.* 52(4):683-700.

Huang, W.T.; Yu, H.C., Hsu, C.C., Liao, C.F., Gong, H.Y., Lin, C.J.F., Wu, J.L., Weng, C.F. Steroid hormones (17 $\beta$ -estradiol and hydrocortisone) upregulate hepatocyte nuclear factor

(HNF)-3b and insulin-like growth factors I and II expression in the gonads of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in vitro. *Theriogenology* 68 (2007) 988–1002.

Leese, HJ. (2002). Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays*. 24(9):845-849.

Lequarré, AS, Feugang, JM, Malhomme, O, Donnay, I, Massip, A, Dessy, F and Van Langendonck, A. (2001). Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of in vitro culture. *Mol Reprod Dev*. 58(1):45-53.

Lim, MA, Riedel, H and Liu, F. (2004). Grb10: more than a simple adaptor protein. *Front Biosci*. 1(9):387-403.

Lonergan, P, Woods, A, Fair, T, Carter, F, Rizos, D, Ward, F, Quinn, K and Evans A. (2007). Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reprod Fertil Dev*. 19(7):861-868.

Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedure guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. 1998. 3rd. ed. Savoy, IL: IETS.

Mayorga MP, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. (2000). Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J.Clin. Endocrinol. Metab*. 85(9):3365-3369.

Melo, EO, Canavessi, AMO, Franco, MM and Rumpf, R. (2007). Animal transgenesis: state of the art and applications. *J. Appl. Genet*. 48(1): 47-61.

Meuwissen, TH. (1998). Optimizing pure line breeding strategies utilizing reproductive technologies. *J. Dairy Sci.*, 81 Suppl (2), 1998. 47-54

- Mollo, M.R.; Ramos, A.F.; Pivato, I.; Guimarães Neto, A.G.; Franco, M.M.; Rumpf, R.; Sartori, R. (2006). Improvement in embryo recovery using double uterine flushing in cattle, corroborating data from a previous study. *Acta Scientiae Veterinariae* 34 (Suppl. 1):516 (abstract).
- Moore, K, Kramer, JM, Rodriguez-Sallaberry, CJ, Yelich, JV and Drost M. (2007). Insulin-like growth factor (IGF) family genes are aberrantly expressed in bovine conceptuses produced in vitro or by nuclear transfer. *Theriogenology*. 68(5):717-727.
- Niemann, H. and Wrenzycki, C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*. 53:21-34.
- Nowak-Imialek, M, Wrenzycki, C, Herrmann, D, Lucas-Hahn, A, Lagutina, I, Lemme, E, Lazzari, G, Galli, C and Niemann, H. (2008). Messenger RNA expression patterns of histone-associated genes in bovine preimplantation embryos derived from different origins. *Mol. Reprod. Dev.* 75:731-743.
- Pantoja, C, de Los Ríos, L, Matheu, A, Antequera, F and Serrano M. (2005). Inactivation of imprinted genes induced by cellular stress and tumorigenesis. *Cancer Res.* 65(1):26-33.
- Pereira, DC, Dode, MA and Rumpf, R. (2005). Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. 63(4):1131-1141.
- Racedo, SE, Wrenzycki, C, Herrmann, D, Salamone, D and Niemann, H. (2008). Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine in vitro matured oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 75:17-25

Rizos, D, Gutiérrez-Adán, A, Pérez-Garnelo, S, De La Fuente, J, Boland, MP and Lonergan, P.

(2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68(1):236-243.

Rossignol, S, Steunou, V, Chalas, C, Kerjean, A, Rigolet, M, Viegas-Pequignot, E, Jouannet, P,

Le Bouc, Y and Gicquel C. (2006). The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. *J Med Genet.* 43(12):902-907.

Ruddock, NT, Wilson, KJ, Cooney, MA, Korfiatis, NA, Tecirlioglu, RT and French, AJ. (2004).

Analysis of imprinted messenger RNA expression during bovine preimplantation development. *Biol Reprod.* 70(4):1131-1135.

Santos JE, Cerri RL, Sartori R. (2008). Nutritional management of the donor cow.

*Theriogenology.* 69(1):88-97.

Sasaki, H and Matsui, Y. (2008). Epigenetic events in mammalian germ-cell development:

reprogramming and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 9:129-140.

Sato, A, Otsu, E, Negishi, H, Utsunomiya, T and Arima T. (2007). Aberrant DNA methylation of

imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod.* 22(1):26-35.

Sawai, K, Kageyama, S, Moriyasu, S, Hirayama, H, Minamihashi, A and Onoe, S. (2005).

Analysis of mRNA transcripts for insulin-like growth factor receptors and binding proteins in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells.*

7(3):189-198.

- Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J. (2002). Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum. Reprod. Update.* 8(5):413-421.
- Smith, SL, Everts, RE, Tian, XC, Du, F, Sung, LY, Rodriguez-Zas, SL, Jeong, BS, Renard, JP, Lewin, HA and Yang, X. (2005). Global gene expression profiles reveal significant nuclear reprogramming by the blastocyst stage after cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(49):17582-17587.
- Spearow JL, Barkley EM. (1999a). Genetic control of hormone-induced ovulation rate in mice. *Biol. Reprod.* 61:851-856.
- Spearow JL, Nutson PA., Mailliard WS, Porter M, Barkley M. (1999b). Mapping genes that control hormone-induced ovulation rate in mice. *Biol. Reprod.* 61: 857-872.
- Vandaele, L, Goossens, K, Peelman, L and Van Soom A. (2008). mRNA expression of Bcl-2, Bax, caspase-3 and -7 cannot be used as a marker for apoptosis in bovine blastocysts. *Anim Reprod Sci.* 106(1-2):168-173.
- Wang, L, Balas, B, Christ-Roberts, CY, Kim, RY, Ramos, FJ, Kikani, CK, Li, C, Deng, C, Reyna, S, Musi, N, Dong, LQ, DeFronzo, RA and Liu, F. (2007). Peripheral disruption of the Grb10 gene enhances insulin signaling and sensitivity in vivo. *Mol Cell Biol.* 27(18):6497-505.
- Yamasaki-Ishizaki, Y, Kayashima, T, Mapendano, CK, Soejima, H, Ohta, T, Masuzaki, H, Kinoshita, A, Urano, T, Yoshiura, K, Matsumoto, N, Ishimaru, T, Mukai, T, Niikawa, N and Kishino T. (2007). Role of DNA methylation and histone H3 lysine 27 methylation in tissue-specific imprinting of mouse Grb10. *Mol. Cell Biol.* 27(2):732-742.

Yang, MY and Rajamahendran, R. (2002). Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 70(3-4):159-169.