



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

**UTILIZAÇÃO DA ACTINOMICINA D COMO MÉTODO
DE ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OVÓCITOS
BOVINOS DESTINADOS À TRANSFERÊNCIA
NUCLEAR**

MARCELO TIGRE MOURA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**BRASÍLIA/DF
MARÇO/2007**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**UTILIZAÇÃO DA ACTINOMICINA D COMO MÉTODO DE ENUCLEAÇÃO
QUÍMICA DE OVÓCITOS BOVINOS DESTINADOS À TRANSFERÊNCIA
NUCLEAR**

MARCELO TIGRE MOURA

ORIENTADOR: RODOLFO RUMPF

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO: 259/07

BRASÍLIA/DF
MARÇO/2007

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

**UTILIZAÇÃO DA ACTINOMICINA D COMO MÉTODO DE ENUCLEAÇÃO
QUÍMICA DE OVÓCITOS BOVINOS DESTINADOS À TRANSFERÊNCIA
NUCLEAR**

MARCELO TIGRE MOURA

**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 PRODUÇÃO
ANIMAL.**

APROVADA POR:

**Rodolfo Rumpf, PhD (Embrapa Cenargen)
(ORIENTADOR) CPF: 295718049-91
E-mail: rodolfo@cenargen.embrapa.br**

**Carolina Madeira Lucci, PhD (Universidade de Brasília)
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 490390241-20
E-mail: cmlucci@unb.br**

**Maurício Machaim Franco, Dsc (Embrapa Cenargen)
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 517692476-53
E-mail: mfranco@cenargen.embrapa.br**

BRASÍLIA/DF, 28 de MARÇO de 2007.

FICHA CATALOGRÁFICA

Moura, Marcelo Tigre
UTILIZAÇÃO DA ACTINOMICINA D COMO MÉTODO DE
ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OVÓCITOS BOVINOS DESTINADOS À
TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

Marcelo Tigre Moura; orientação de Rodolfo Rumpf. – Brasília,
2007.

60p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de
Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2007.

1. Enucleação. 2. Ovócito. 3. Actinomicina D. 4. Transferência
Nuclear. I. Rumpf, R. II. PhD

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

MOURA, M. T. Utilização da actinomicina D como método de enucleação química de ovócitos bovinos destinados à transferência nuclear. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2007, 60 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Marcelo Tigre Moura

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: **UTILIZAÇÃO DA ACTINOMICINA D
COMO MÉTODO DE ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OVÓCITOS BOVINOS
DESTINADOS À TRANSFERÊNCIA NUCLEAR**

GRAU: Mestre ANO: 2007

É concedida à 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.

Marcelo Tigre Moura

CPF 036984634-66

SCLN 316 bloco F Sala 222

CEP 70775-500 - Brasília/DF - Brasil

Telefone: (61) 3448 4692 E-mail: tigremoura@cenargen.embrapa.br

Agradecimentos

Aos meus pais pelo amor, carinho e apoio incondicional durante toda minha vida.

Aos meus irmãos (Francisco, Romero, Helena e Virgínia), primos e tios pelo carinho e suporte as minhas escolhas.

À Fernanda, pelo amor e compreensão. Eu te amo!

À minha prima e madrinha Adriana, pelo carinho em todos estes anos.

Ao meu tio Roberto, por todo incentivo e confiança.

À galera do Colégio de Aplicação do Recife, CAP98, vocês são demais!!

Ao Dr. Rodolfo Rumpf, pela oportunidade de realizar o sonho de trabalhar com clonagem, pela orientação e suporte durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao amigo Regivaldo, pela confiança, incentivo e inúmeros ensinamentos.

Aos Drs. e, mais importante, amigos Eduardo e Maurício, pela amizade, ensinamentos e incentivo.

Aos grandes amigos Tomaz, Normandes, Léo Gaúcho e Ivo, muito obrigado.

Aos amigos Fred, Walliston, Raimundinho, Rosângela, Renata, Ligiane, Dany Pereira, Marina, Juliana, Aline, Geórgia, Rafael, Dani Brandão, Natalie, Thiago, Grazielli, José, Sarah, Marcos, Rabinho, Fernanda, Anderson, Anísio, Emivaldo, Tatiane, Ana Cláudia, Valquíria, Edilaine, Marcela, Clarice e todos os membros da Fazenda Sucupira.

Aos professores Dra. Valéria Wanderley Teixeira e Dr. Marcos Antônio Lemos de Oliveira, pelo exemplo profissional, muitos ensinamentos e incentivos que tornaram a busca pelo mestrado possível.

Ao amigo Batista, pela amizade e pelos tantos porquinhos servidos no muita bóia.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo suporte para a realização deste trabalho.

A UnB, funcionários e professores, pela contribuição nesta etapa de minha formação.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	01
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
Histórico da Enucleação de ovócitos	03
Estratégias Alternativas de Enucleação	08
Métodos de Enucleação Química	09
Actinomicina D	11
OBJETIVO GERAL	14
HIPÓTESE	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO ÚNICO	
AVALIAÇÃO DE OVÓCITOS TRATADOS COM ACTINOMICINA D E SUA UTILIZAÇÃO COMO CITOPLASMAS RECEPTORES PARA TRANSFERÊNCIA NUCLEAR	25
RESUMO	26
ABSTRACT	28
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	32
Coleta dos ovários e seleção dos ovócitos	32
Maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos	32
Bloqueio da transcrição e replicação por Actinomicina D	33
Desnudação, quantificação da maturação e ativação dos ovócitos	33
Citogenética	34
Cultivo de células somáticas	35
Transferência Nuclear	35
Sistema de cultivo	36
Teste de TUNEL	37
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÃO	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

6DMAP	6-Dimethylaminopurine
AI	Anáfase I
BL	Blastocisto
CCO	Complexo <i>cumulus</i>-ovócito
CO₂	Dióxido de Carbono
CP	Corpúsculo Polar
DMEM	Dulbecco's Minimum Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LAV	Meio de Lavagem
LH	Hormônio Luteinizante
MCI	Massa celular interna
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MPF	Fator promotor da metáfase
NaCl	Cloreto de Sódio
O₂	Oxigênio
PI	Prófase I
PBS	Phosphate Buffered Saline
RNA	Ácido ribonucléico
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Fluido Sintético de Oviduto
SOFaaci	Fluido Sintético de Oviduto com Aminoácidos, citrato e mio- inositol
TI	Telófase I
TII	Telófase II
TN	Transferência Nuclear
UV	Ultravioleta
VG	Vesícula Germinativa

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Maturação e desenvolvimento embrionário partenogenético a partir de ovócitos submetidos a diferentes tratamentos de actinomicina D.	41
Tabela 2. Distribuição das fases da maturação dos ovócitos submetidos aos diferentes tratamentos de actinomicina D e que não apresentavam CP.	42
Tabela 3. Avaliação da maturação após a análise dos ovócitos tratados com actinomicina D que não apresentavam CP.	43
Tabela 4. Desenvolvimento embrionário partenogenético controle do experimento 1.	45
Tabela 5. Avaliação do desenvolvimento de embriões obtidos por TN após enucleação química com actinomicina D.	46
Tabela 6. Índice apoptótico de embriões partenogenéticos e reconstruídos por TN submetidos a diferentes tratamentos de Actinomicina D.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ovócito em MII que não apresentava CP após 24 horas de MIV.	42
Figura 2. Morfologia dos cromossomos de ovócito em MII não tratado.	44
Figura 3. Morfologia dos cromossomos de ovócito tratado com actinomicina D com 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ por 14 horas.	45

UTILIZAÇÃO DA ACTINOMICINA D COMO MÉTODO DE ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OVÓCITOS BOVINOS DESTINADOS A TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

Resumo

A clonagem por Transferência Nuclear (TN) é uma técnica pouco eficiente e laboriosa. O processo, do ponto de vista técnico, é um dos principais fatores responsáveis pela quantidade e qualidade dos embriões produzidos. A enucleação é a etapa mais agressiva da TN. Apesar dos métodos alternativos propostos, a enucleação permanece sendo realizada como inicialmente descrita nos anos 50. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do inibidor irreversível de transcrição e replicação actinomicina D (Fluka[®], Suíça) como método de enucleação química de ovócitos. Ovócitos foram maturados *in vitro* (MIV) por 4 ou 6 horas e expostos a actinomicina D (T1, controle; T2 = 1,0 µg ml⁻¹ / 16hs; T3 = 1,0 µg ml⁻¹ / 14hs; T4 = 2,5 µg ml⁻¹ / 14hs; T5 = 5,0 µg ml⁻¹ / 14hs). Os ovócitos foram desnudados após 20 horas de MIV e ativados com 24-26 horas de MIV. As taxas de clivagem foram avaliadas 48 horas após a ativação (D2) e as de blastocisto após 168 (D7) e 192 (D8) horas de cultivo. Parte dos ovócitos foi fixada e corada com lacmóide ou orceína para determinação da fase da meiose ou para visualização da morfologia dos cromossomos, respectivamente. Posteriormente, ovócitos tratados com actinomicina D foram utilizados para clonagem por TN, sendo que parte dos embriões (D3) foi fixada para avaliar o percentual de células apoptóticas através do teste de TUNEL. Os dados relativos às taxas de maturação, clivagem e blastocisto foram analisados pelo teste do Qui-quadrado e os percentuais de apoptose pelo teste de Mann-Whitney. A taxa de maturação (T1 = 90,4%; T2 = 82,3%; T3 = 79,1%; T4 = 83,4%; T5 = 74,7%), clivagem (T1 = 68,9%; T2 = 46,0%; T3 = 49,7%; T4 = 33,4%; T5 = 29,3%) e de blastocisto em D8 (T1 = 41,1%; T2 = 1,4%; T3 = 1,3%; T4 = 0,9%; T5 = 0,0%) após o tratamento com actinomicina D foi significativamente menor. Dos ovócitos fixados, 63,2% estavam em metáfase II (MII). Ao avaliar os cromossomos, foi observada uma descondensação significativa com as concentrações mais altas (2,5 e 5,0 µg ml⁻¹). Os demais tratamentos não apresentaram modificações perceptíveis. Ovócitos tratados com 1,0 µg ml⁻¹ por 14 horas foram utilizados como citoplasmas receptores. A taxa de clivagem dos embriões reconstruídos (61,3%) foi

semelhante ao grupo partenogênético tratado (61,3%) e inferior ao não tratado com actinomicina D (70,2%), embora a taxa de blastocisto tenha sido mais alta no grupo de TN (11,8%) em relação ao controle tratado (3,6%) e inferior ao controle sem tratamento (38,0%). Ao analisar o índice apoptótico dos embriões, os embriões partenogênicos tratados tiveram um índice maior que os partenogênicos não tratados (24,2% contra 4,8%). No entanto, os embriões oriundos de TN com ovócito tratado não foram diferentes estatisticamente dos TN controle (9,3 contra 13,0%). A actinomicina D é eficiente no bloqueio da transcrição e replicação embrionária. Além disso, foi possível obter embriões reconstruídos que apresentavam percentual de células apoptóticas indistinguível do controle.

Palavras-chave: Bovino, Ovócito, Enucleação, Actinomicina D e Transferência Nuclear.

USE OF ACTINOMYCIN D AS A CHEMICAL ENUCLEATION METHOD OF BOVINE OOCYTES DESTINED FOR NUCLEAR TRANSFER

Abstract

Cloning by Nuclear Transfer (NT) is a low efficiency and labor intense technique. The process, in technical terms, is one of the main factors responsible for both embryo quality and quantity. Enucleation is the most aggressive step. Although alternative methods have been proposed, it remains mainly as it has been first described in the early fifties. The objective of the present work was to evaluate the effect of transcription and replication inhibitor actinomycin D as a chemical enucleation method for oocytes. Oocytes were matured in vitro (MIV) for 4 or 6 hours and exposed to actinomycin D (T1, control; T2 = 1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ / 16hs; T3 = 1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ / 14hs; T4 = 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ / 14hs; T5 = 5,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ / 14hs). The oocytes were denuded 20 hours after MIV and activated 24-26 hours after MIV. The cleavage rate was recorded 48 hours post activation and the blastocyst at 168 (D7) and 192 (D8) hours of culture. Some oocytes were fixed and stained with lacmoyd or orcein to determine the maturation status or for chromosome morphology evaluation, respectively. Furthermore, oocytes treated with actinomycin D were used as recipient cytoplasts for NT, while some embryos (D3) were fixed to evaluate the percentage of apoptotic nuclei by the TUNEL assay. The data relative to the maturation, cleavage and blastocyst rate were analyzed by the chi-square test and apoptosis percentages by the Mann-Whitney test. The maturation (T1 = 90,4%; T2 = 82,3%; T3 = 79,1%; T4 = 83,4%; T5 = 74,7%), cleavage (T1 = 68,9%; T2 = 46,0%; T3 = 49,7%; T4 = 33,4%; T5 = 29,3%) and blastocyst rate at D8 (T1 = 41,1%; T2 = 1,4%; T3 = 1,3%; T4 = 0,9%; T5 = 0,0%) after actinomycin D treatment was significantly different. Analyzing the fixed oocytes, 63,2% were in MII. While evaluating the chromosomes, it was observed a significant uncoiling when exposed to higher concentrations (2,5 and 5,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$). The remaining groups had no apparent perceptible modifications. Furthermore, oocytes treated with 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for 14 hours were used as recipient cytoplasts. The cleavage rate (61,3%) was similar to the actinomycin D treated control group (61,3%) and lower than the non-treated control (70,2%), although the blastocyst rate was higher in the NT group (11,8%) comparing to the treated control (3,6%) and lower to the untreated control (38,0%). After analyzing the embryos for

apoptotic cells, the treated parthenogenetic embryos had a higher index than the parthenogenetic control (24,2% vs. 4,8%). However, the NT embryos generated by treated cytoplasts wasn't statistically different from the NT control (9,3 vs. 13,0%). The actinomycin D treatment is efficient to block embryonic transcription and replication. Moreover, it was possible to obtain reconstructed embryos that possess an apoptotic cell index indistinguishable from the control.

Key words: Bovine, Oocyte, Enucleation, Actinomycin D and Nuclear Transfer.

INTRODUÇÃO

A técnica de TN permite expor o núcleo de uma célula diferenciada ao citoplasma de um ovócito. Esta interação permite a reversão dos mecanismos que controlam o fenótipo celular, permitindo gerar células que são capazes de recapitular o desenvolvimento *in vivo* (Hochedlinger e Jaenisch, 2006; Wilmut et al., 1997).

Do ponto de vista científico, a técnica tem grande potencial por apresentar duas importantes propriedades: produção de animais a partir de uma única célula e a reversão global dos mecanismos epigenéticos. A partir destas particularidades, autores utilizaram a TN a partir de neurônios sensitivos olfatórios para comprovar que a escolha dos seus receptores é regulada por mecanismos epigenéticos, sem apresentar alterações genômicas (Eggan et al., 2004; Li et al., 2004a). Além disso, foi demonstrada funcionalmente a participação das alterações epigenéticas na determinação do melanoma (Hochedlinger et al., 2004). A contribuição das alterações genéticas na especialização dos neurônios foi também avaliada pela TN (Osada e Yagi, 2006). A clonagem permanece hoje como uma ferramenta para distinguir mecanismos genéticos dos epigenéticos (Hochedlinger e Jaenisch, 2006) e a sua popularização está estreitamente relacionada ao aumento de sua eficiência.

Para conservação de recursos genéticos, a replicação de genótipos raros permitiria aumentar a chance de preservar raças (Wells et al., 1998; Moura et al., 2003) ou espécies (Loi et al., 2001), reduzindo a perda de alelos, embora haja muita controvérsia sobre este estratégia, inclusive dentro da comunidade científica (Holt et al., 2004).

Suas aplicações comerciais são bem diversas. Replicação de genótipos de animais de alto mérito genético (Westhusin et al., 2001), com maior resistência a doenças (Westhusin et al., 2001), aumento da disseminação de genes em diferentes condições de produção e da confiabilidade dos testes de progênie (Bousquet e Blondin, 2004). Associada à transgênese (Melo et al., 2005), aumenta a eficiência de produção deste tipo de animal (Schnieke et al., 1997; Brophy et al., 2003; Kues e Niemann, 2004), permitindo produzir, órgãos para xenotransplante (Phelps et al.,

2003), animais mais produtivos (Brophy, et al., 2003) e proteínas exógenas de interesse comercial com maior eficiência (Kuroiwa et al., 2002, 2004).

Apesar do seu potencial científico e comercial, a clonagem por TN permanece como uma técnica pouco eficiente e laboriosa. Esta ineficiência se deve a vários fatores, como por exemplo, expressão gênica aberrante (Moura et al., 2006a, 2006b). Independentemente, parte é devido a aspectos técnicos.

A produção dos embriões clonados é realizada através da micromanipulação dos ovócitos. A eficiência de produção dos embriões é essencialmente dependente dos aspectos relacionados a micromanipulação. É um processo demorado e delicado. Por isso, o seu aperfeiçoamento será obtido através da redução do tempo requerido e das agressões as quais as células são submetidas.

A enucleação é a etapa mais agressiva da técnica, tendo grande impacto na eficiência final. Sua simplificação terá grande impacto na produção de embriões reconstruídos. Por isso, diversos métodos alternativos foram descritos na literatura (Li et al., 2004b). Todos eles tinham como objetivo simplificar o processo e ampliar o número de estruturas viáveis para reconstrução. No entanto, estes métodos falharam, não existindo no momento alternativas ao método tradicional de remoção do DNA de forma mecânica.

A utilização de inibidores irreversíveis de replicação e/ou transcrição seria uma alternativa aos métodos químicos, por não depender da ativação do gameta para o sucesso da enucleação (fator que reduz o potencial de desenvolvimento dos embriões reconstruídos). Esta vantagem motivou a testar a actinomicina D, um inibidor de transcrição e replicação com método de inibição do DNA do ovócito, sem haver a necessidade de removê-lo.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com actinomicina D em ovócitos e investigar se é possível produzir embriões reconstruídos com células somáticas a partir deste tipo de citoplasma.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

HISTÓRICO DA ENUCLEAÇÃO DE OVÓCITOS

A clonagem por TN é uma técnica pouco eficiente e laboriosa. A produção dos embriões requer uma seqüência de manipulações dos ovócitos, causando injúrias aos mesmos e impossibilitando a produção em larga escala destas estruturas. A eficiência de produção dos embriões está altamente relacionada ao sucesso desta extensiva manipulação.

A remoção do DNA do ovócito é fundamental para garantir o potencial de desenvolvimento do embrião produzido, pois células tetraplóides são normalmente eliminadas progressivamente na formação de quimeras (Eakin et al., 2005), sendo concentradas em anexos placentários (Nagy et al., 1993), não havendo relatos replicáveis de nascimento de mamíferos exclusivamente tetraplóides (Eakin e Behringer, 2003). Existe um relato de nascimento após a indução da tetraploidia em camundongos, mas os autores não relataram o cariótipo destes animais. Por isso, não é possível excluir a possibilidade de que estes embriões tiveram um bloqueio ineficiente da divisão mitótica.

A enucleação é a etapa mais invasiva e agressiva aos ovócitos, causando danos aos mesmos, diminuindo seu volume e reduzindo a qualidade dos embriões (Westhusin et al., 1996). Por isso, muito esforço tem sido direcionado para seu aperfeiçoamento. Recentemente, foi descrito que a enucleação remove proteínas importantes do fuso e causa aneuploidia na maioria das estruturas (Simerly et al., 2003). Por isso, acredita-se que apenas uma inovação técnica poderá permitir obter sucesso em clonar primatas (Yang et al., 2007).

Historicamente, seu desenvolvimento se confunde com o desenvolvimento da própria técnica, onde os relatos de avanço técnico permitiram avanços do conhecimento biológico.

O primeiro relato foi em anfíbios (Briggs e King, 1952), como descrito acima. O método de enucleação foi baseado num relato em bactérias (Korzsh e Strahle,

2002) e é até hoje a base da metodologia utilizada. Através do uso de micromanipuladores acoplados a um sistema de seringas com ar, foi realizada a remoção do DNA materno norteadada pela posição do pólo animal do ovócito anfíbio. Posteriormente, uma célula de uma blástula, era cuidadosamente removida do embrião. Este tipo de célula apresenta maior diâmetro que a pipeta e após diversas passagens dentro da mesma, sua membrana era rompida e seu núcleo isolado. Em seguida, o núcleo era injetado no gameta enucleado.

Não foi empregado um método para confirmação da enucleação. Para estimar o sucesso do método, os autores produziram embriões androgenéticos, enucleando ovócitos fecundados e obtiveram uma estimativa de 94-99% de eficiência. Devido à ausência de confirmação da remoção de DNA, esta estratégia tem sido chamada de enucleação “cega” (Li et al., 2004b).

Muitos dos trabalhos posteriores foram realizados em *Xenopus leavis*, no laboratório do Dr. John Gurdon. Inicialmente, o autor desenvolveu a enucleação por irradiação, ocorrendo após a exposição à UV. Além disso, o autor empregou uma particularidade da espécie como método de confirmação. Existem animais que apresentam dois nucléolos, devido a uma mutação (Gurdon, 2006). Ao utilizar células somáticas com número diferente de nucléolos das doadoras de óvulos, o autor ao analisar as células do embrião certificava-se de sua origem. Este foi o primeiro relato que indubitavelmente confirmava os resultados. Além disso, a exposição à UV facilitava a manipulação dos ovócitos, pois dissolvia uma membrana gelatinosa comum em óvulos de *Xenopus* (Gurdon, 2006).

Em meados da década de 70, foram produzidos os primeiros embriões por TN em mamíferos (Bromhall, 1975). Aparte dos avanços que permitiram manipular ovócitos muito menores que os anfíbios, o autor não descreveu um método apropriado de enucleação. Apesar disso, o autor confirma a produção de embriões diplóides, nos sugerindo uma “enucleação estocástica”. No entanto, os embriões se desenvolveram apenas até a fase de mórula, possivelmente devido a tetraploidia. Em 1978, Modlinski descreveu o desenvolvimento de embriões novamente tetraplóides, após a injeção de células embrionárias em embriões de camundongos (Modlinski, 1978). Um fato comum destes relatos foi à baixa eficiência. Bromhall

obteve apenas 25% de sucesso na reconstrução e 3% de clivagem, enquanto que apenas 9% dos zigotos utilizados por Modlinski sobreviveram à manipulação.

Durante este mesmo período, Illmensee e Hoppe relataram o nascimento de camundongos ginogenéticos e androgenéticos (Hoppe e Illmensee, 1977). Curiosamente, ao utilizar citocalasina B para bloquear a divisão mitótica em embriões onde um pró-núcleo foi removido, os autores observaram um aumento muito significativo da sobrevivência das estruturas. A citocalasina é um potente inibidor da polimerização dos filamentos de actina e com isso, desestabiliza o citoesqueleto da célula. Esta inovação aumentou muito significativamente a sobrevivência dos ovócitos após a enucleação. A partir deste relato, o reagente tornou-se indispensável no processo de TN.

Apesar da importância do trabalho para o desenvolvimento técnico da TN, os resultados obtidos não foram replicáveis, devido à impressão genômica estabelecida durante a gametogênese. Por isso, os genomas paterno e materno são funcionalmente diferentes (Barton et al., 1984).

Em 1981 novamente Illmensee e Hoppe, relataram agora o que seria o primeiro trabalho em mamíferos onde os ovócitos foram devidamente enucleados (Illmensee e Hoppe, 1981). No entanto os resultados mostraram-se novamente inconsistentes.

Apesar do esforço despendido para replicar os dados de Illmensee e Hoppe, a estratégia de enucleação desenvolvida por Mcgrath e Solter em 1983 e 1984, seria utilizada como referência por muito tempo (McGrath e Solter, 1983, 1984). A enucleação era realizada pela remoção de um filamento de citoplasma, contendo os dois pró-núcleos. Em seguida, um blastômero era depositado no espaço perivitelino. Através de vírus inativado, ocorria à fusão entre a célula embrionária e ovócito enucleado. A grande virtude da metodologia foi evitar ao máximo a remoção de citoplasma e o rompimento da membrana plasmática do gameta (Solter, 2000).

Ainda em meados da década de 80, Steen Willadsen descreveu o nascimento dos primeiros ovinos clonados a partir de células embrionárias (Willadsen, 1986). Em seu experimento, associou as inovações descritas acima e a eletrofusão como método de reconstrução. Com isso, 90% das estruturas sobreviveram à intervenção.

Apesar do avanço, a ausência de um método confiável de avaliação da enucleação após sua realização permanecia a ser desenvolvido. Em ruminantes, que possuem o ovócito escuro pela grande quantidade de lipídeos, é normalmente realizada pela remoção do corpúsculo polar e parte do citoplasma adjacente. A quantidade de citoplasma removido é bastante variável, mas com o valor médio de 10-30%. Este parâmetro é importante, pois o volume final do ovócito é fundamental para sua capacidade de desenvolvimento. O seu manuseio, principalmente o método de desnudamento, deve ser bastante cuidadoso para evitar o deslocamento da placa metafásica em relação ao CP. Este deslocamento pode aumentar significativamente o volume do ovócito a ser removido (Li et al., 2004b). O percentual de ovócitos com grande deslocamento da placa em relação ao CP pode chegar a 60% (Mitalipov et al., 1999). Outro fator importante é o período em que o ovócito é submetido ao procedimento. Apesar do envelhecimento do gameta permitir aumentar o percentual de ativação partenogenética, neste momento observa-se um deslocamento da placa metafásica (Nour e Takahashi, 1999), o que resulta em baixas taxas de enucleação (Prather et al., 1987).

Em 1989, Smith e Wilmut pioneiramente utilizaram em ovinos a coloração com o corante DNA específico Hoechst 33342 e expostos a luz UV para confirmação da remoção (Smith e Wilmut, 1989). Ao expor o DNA à luz, os cromossomos tornam-se fluorescentes, permitindo sua visualização. Com isso, a biópsia obtida do ovócito deve apresentar dois pontos visíveis contendo DNA, a placa metafásica e o CP. Posteriormente, Mark Westhusin e colaboradores demonstraram que o método não reduzia as taxas de nascimento de clones (Westhusin et al., 1992). Uma particularidade deste último experimento é que os ovócitos foram bipartidos, sendo posteriormente a porção com DNA descartada. Esta estratégia foi bastante utilizada durante o período de experimentos utilizando células embrionárias como doadoras. Provavelmente esta redução drástica do volume citoplasmático era compensada pelo volume do blastômero, que recuperava o volume inicial da célula.

Em 2001, foi descrito um método alternativo de manipulação, sem utilizar os equipamentos comumente usados, um microscópio invertido com micromanipuladores acoplados (Vajta et al., 2001). Nesta estratégia, os ovócitos também são bipartidos e após a exposição à UV as porções sem o DNA são selecionadas. Em seguida, duas porções são fusionadas a uma célula somática, para obtenção de estruturas reconstruídas com volume compatível. Apesar das altas taxas de embriões obtidas, a quantidade inicial de ovócitos é reduzida pela metade. Apesar da aparente vantagem da alternativa, sua aplicação tem sido pouco difundida e é cercada de ceticismo (Fulka et al., 2004).

Em primatas, camundongos e algumas raças de coelhos é possível visualizar a placa metafásica sem qualquer técnica auxiliar. No entanto, alguns grupos utilizam a coloração com Hoechst 33342 para confirmação da remoção do DNA em coelhos e macacos.

Apesar da importância do método, a utilização do corante associado à exposição à UV é cercada de controvérsia. Ao temer possíveis efeitos da UV, alguns autores avaliaram e comprovaram seu efeito nocivo no desenvolvimento embrionário (Smith, 1993; Dominko et al., 2000). Apesar disso, os nascimentos de animais clonados oriundos de ovócito expostos a UV demonstra que a exposição não inviabiliza o citoplasma da célula.

Posteriormente, diferentes fluorocromos foram testados como alternativa ao corante Hoechst, embora apenas a Rodamina tenha apresentado resultados satisfatórios (Dominko et al., 2000). No entanto, por não ser capaz de penetrar a membrana do ovócito, ele deve ser injetado, aumentando o tempo requerido para cada estrutura e necessitando perfurar a membrana plasmática.

Uma alternativa ao corante é a utilização do microscópio Pol-Scope, que permite visualizar a placa metafásica inclusive em ovócitos bovinos (Liu et al., 2000). No entanto, seu alto custo dificulta sua aplicação (Fulka et al., 2004).

ESTRATÉGIAS ALTERNATIVAS DE ENUCLEAÇÃO

Apesar da repetibilidade da metodologia atual, muito esforço tem sido gasto para desenvolver métodos alternativos para simplificar o processo.

Bordignon e Smith demonstraram que os ovócitos pré-ativados em telófase II (TII), podem ser enucleados com uma redução mínima do citoplasma devido à posição da placa metafásica, bem próxima à membrana (Bordignon e Smith, 1998). Apesar da vantagem utilizando células embrionárias como doadoras, espera-se uma redução da eficiência ao utilizar células somáticas (devido a redução do MPF, fator promotor da metáfase, essencial para o remodelamento do núcleo doador somático e prejudicial ao embrionário), mas a expectativa não foi confirmada ao utilizar células somáticas transfectadas (Bordignon et al., 2003). Os autores acreditam que a alteração no ciclo celular após a transformação seria o motivo deste resultado inesperado. Apesar de não necessitar expor o ovócito a corantes, o método não reduz o trabalho e tempo despendido ao processo.

Anteriormente, a exposição ao corante Hoechst e a UV por um curto período, mostrou-se capaz em obter ovócitos bloqueados, incapazes de desenvolver (Wagoner et al., 1996). No entanto, este método é bastante agressivo e pouco eficiente em mamíferos (Wagoner et al., 1996; Bordignon e Smith, 1999). Uma alternativa demonstrada recentemente foi à aplicação da exposição dos ovócitos a radiação X após a incubação com o ácido n-2-hidroxiethylpiperazina-n-2-atanesulfanico, como método de inativação do DNA (Kim et al., 2004). Foi obtida uma taxa estatisticamente semelhante de embriões em relação ao controle. No entanto, não foi relatado o nascimento de animais a partir desta estratégia nem avaliações criteriosas do possível efeito deste tipo de radiação no desenvolvimento destes embriões.

Uma alternativa seria utilizar a centrifugação diferencial. Esta estratégia é muito utilizada para enuclear células somáticas, permitindo produzir populações bastante puras de citoplasma. Tatham e colaboradores fizeram o primeiro relato desta estratégia em ovócitos (Tatham et al., 1995). Apesar de produzir gametas sem núcleo, o processo foi bastante agressivo, fragmentando os ovócitos e apresentando

uma eficiência relativamente baixa. Além disso, é necessário remover a zona pelúcida, o que requer um cultivo diferencial, individual das estruturas (Vajta et al., 2000). Recentemente, um grupo independente tentou replicar o resultado e novamente obteve índices baixos de enucleação (Savard et al., 2004).

MÉTODOS DE ENUCLEAÇÃO QUÍMICA

Os métodos de enucleação química são considerados ideais, pois permitem sua realização sem a manipulação dos gametas (Fulka et al., 2004). Alguns métodos foram descritos, com resultados variáveis. Com isso, seria possível obter uma população inicial grande de estruturas para reconstrução.

Fulka e Moor descreveram o primeiro método de enucleação química (Fulka e Moor, 1993). Ao ativar os ovócitos, eles foram expostos à combinação etoposídeo (potente inibidor das topoisomerasas) e ciclohexamida. Esta estratégia permitiu remover o DNA em 96% dos casos, pois todo o DNA concentrou-se no segundo CP. Apesar disso, este método se mostrou eficiente apenas em gametas em MI, apresentando resultados inconsistentes em ovócitos em MII de camundongos e de bovinos (Fulka e Moor, 1993; Savard et al., 2004). Outras desvantagens: a redução drástica da concentração intracelular do MPF, baixa capacidade de desenvolvimento e a possível reversão do processo (Elsheikh et al., 1997), através da fusão espontânea do CP e o ovócito. Usando etoposídeo associado com ciclohexamida após a ativação com etanol, foi possível produzir um camundongo clonado a partir de células-tronco embrionárias (Gasparrini et al., 2003).

Em 2000, Baguisi e Overström publicaram um curto relato de um novo método de enucleação química (Baguisi e Overstrom, 2000). Neste relato, os autores afirmam ter obtido 54% de eficiência, contra 3,7% da obtida de forma espontânea. Foi utilizada a demecolcina que é um potente desestabilizador de microtúbulos e liga-se a dímeros de tubulina impedindo sua polimerização. Ela foi utilizada após a ativação dos ovócitos de camundongos com ionomicina ou etanol. Após a reconstrução, 70% das estruturas clivaram e 42% resultaram em blastocistos (BL). Em seguida, 30 embriões foram transferidos para três receptoras e duas tornaram-se gestantes. Uma apresentou sete fetos mortos no dia previsto para o

parto. A segunda receptora obteve sete animais vivos, sendo que três foram canibalizados, porém os demais permaneceram vivos. Apesar destes resultados, poucos ovócitos são devidamente enucleados e observa-se um efeito bastante significativo da linhagem de camundongo utilizada (Ibanez et al., 2003).

Embora tenha sido concebida para ser eficiente para enuclear ovócitos, a demecolcina tem sido mais comumente usada para potencializar o método mecânico. O seu uso facilita a visualização do DNA, dispensando o uso de corantes. Este tipo de alternativa tem sido denominado de método assistido de enucleação. Caso as estratégias acima sejam utilizadas em ovócitos em MII, a enucleação deve ser assistida, pois a indução por etoposídeo e demecolcina torna-se reversível (Fulka et al., 2004).

O tratamento dos ovócitos de coelhos com demecolcina por até duas horas antes da enucleação simplificou o procedimento e não afetou o desenvolvimento embrionário (Yin et al., 2002). Em bovinos, foi observado que apenas trinta minutos de exposição à demecolcina foi suficiente para produzir protusões celulares em 93% dos ovócitos (Tani et al., 2006). Importante, o tratamento aumentou a concentração celular de MPF e foi obtido um bezerro após a transferência de apenas quatro embriões.

Outro método assistido é baseado no uso de sacarose. O tratamento de ovócitos com sacarose provoca um efeito curioso no DNA, formando uma protuberância na periferia do ovócito, que permite direcionar a remoção do DNA, como a demecolcina, sem afetar a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos após a fecundação (Wang et al., 2001). Ao remover esta porção do gameta, é possível obter uma eficiência bastante alta. A grande vantagem do método é evitar a exposição da célula ao corante hoechst 33342. Em bovinos, entre 75-86% dos ovócitos apresentaram esta protusão e todas continham a placa metafásica (Liu et al., 2002). Como esperado, o tratamento não reduziu o percentual de embriões produzidos. No entanto, em suínos foi relatado que ovócitos podem apresentar mais de uma protuberância, dificultando a localização do material genético (Li et al., 2004b).

A associação da sacarose e a demecolcina aumentou significativamente a taxa de enucleação de ovócitos suínos, havendo relatos de nascimento (Kawakami et al., 2003). Esta associação foi motivada para facilitar a visualização do DNA do ovócito.

Uma alternativa promissora e ainda não investigada seria utilizar inibidores irreversíveis de replicação. Esta alternativa permitiria bloquear o DNA do ovócito (enucleação química) sem a necessidade de ativar o ovócito, não afetando os níveis citoplasmáticos de MPF.

ACTINOMICINA D

A actinomicina D, também conhecida como actinomicina IV, dactinomycina e actinomicina C₁ é um antibiótico produzido pelo fungo *Streptomyces antibioticus* e reconhecidamente um potente inibidor de transcrição e replicação (Bayona-Bafaluy et al., 2003). Sua ação é primariamente mediada pela inibição da formação das forquilhas de transcrição e replicação mediada pelas DNA e RNA polimerases, respectivamente (Sobell, 1985). Por isso, genes que são altamente expressos (como os responsáveis pela síntese de rRNA), mostraram-se altamente susceptíveis a sua exposição. Doses equivalentes de Desamino-Actinomicina e N-p-Aminofenilaactinomicina, que não se ligam ao DNA, não inibem a transcrição (Goldberg et al., 1962). Liga-se a seqüências que apresentam Guaninas, base pela qual o antibiótico tem alta afinidade. Curiosamente, as seqüências que não possuem guanina e citosina não são afetadas pelo seu tratamento (Goldberg et al., 1962). Apesar disso, sua ligação é independente do estado transcricional da célula. Além disso, a molécula apresenta maior afinidade por seqüências de DNA fita simples.

Células tratadas com o inibidor frequentemente apresentam alterações cromossômicas (Jagiello, 1969). Foi sugerido que este efeito é devido à ação da enzima topoisomerase I, que na presença de actinomicina D aumenta o número de ligações covalentes e clivagens do DNA, tornando-as irreversíveis (Trask e Muller, 1988). As topoisomerasas têm a função de clivar o DNA para permitir aliviar a tensão conformacional gerada pela descondensação do DNA. Em decorrência destes fatos,

acredita-se que actinomicina D não é capaz de clivar ou fragmentar DNA. Curiosamente, a topoisomerase II não é afetada pelo tratamento.

A actinomicina D é muito utilizada em ovócitos e embriões em diversas espécies como inibidor de transcrição (Sullivan et al., 2004; Pivko et al., 2002; Pang e Ge, 1999). No entanto, existe uma grande diversidade de concentrações e períodos de tratamentos descritos na literatura. Muitos destes relatos não apresentam dados de controle do tratamento (Pivko, et al., 2002; Sullivan, et al., 2004), dificultando a interpretação dos dados e a confiabilidade do bloqueio. Este fato é agravado pela ação seletiva da droga. Por isso, é necessário estabelecer tratamentos confiáveis, avaliando funcionalmente sua ação. Outra pergunta importante a ser respondida é se o tratamento para inibição da transcrição e replicação tem algum efeito tóxico ou inespecífico nas células, independente do resultado fisiológico da inibição em células em proliferação (Pivko et al., 2002).

O primeiro relato de enucleação de células somáticas foi utilizando este inibidor associado à ementina, um inibidor ribossomal (Hikawa e Takenaka, 1996, 1997). Foi realizado um ensaio para determinação das concentrações mais eficientes quando associadas, ou seja, determinação da quantidade mínima dos reagentes que associada, inibisse totalmente o potencial mitótico das células (Hikawa e Takenaka, 1996). Através desta metodologia, foi possível estabelecer linhagens a partir de neurônios, utilizando uma pequena quantidade de células iniciais (Hikawa e Takenaka, 1996).

Posteriormente, foi utilizado como um método de enucleação de linhagens imortalizadas, para estudo de interação núcleo-citoplasmática, ao formar células com mitocôndrias de duas origens (Bayona-Bafaluy et al., 2003). Este estudo avaliou diferentes concentrações por diferentes períodos de exposição. Apenas o tratamento mais prolongado, com uma dose moderada, bloqueou sem causar grandes efeitos inespecíficos. Neste caso, foi utilizada uma concentração de $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ por 15 horas. Através da análise de colônias de células sobreviventes após o tratamento foi estimada uma eficiência de 95%. Este resultado foi confirmado posteriormente pela repetição com outras linhagens de células, obtendo 79 e 100% de eficácia em dois ensaios independentes. Os autores concluíram que apenas este tipo de associação

(baixa concentração de actinomicina D por um longo período) permitiria uma boa eficiência de bloqueio associada a uma boa viabilidade citoplasmática (Bayona-Bafaluy et al., 2003).

Recentemente, o mesmo grupo produziu diversas linhagens utilizando o método, sendo necessário determinar diferentes concentrações para cada linhagem a ser enucleada (Bayona-Bafaluy et al., 2005). Apesar disso obteve-se uma eficiência variável, entre 65 -100%. Estes resultados demonstram a necessidade de adaptação do método para cada tipo celular e espécie de interesse. No entanto, não existem relatos desta natureza em ovócitos.

Um fato importante a ser considerado é que o DNA da célula receptora (célula ou ovócito) bloqueado pela actinomicina D permanece dentro da célula por um período ainda não determinado. Seu efeito deve ser considerado em experimentos futuros.

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi testar o antibiótico actinomicina D, reconhecido inibidor irreversível de transcrição e replicação, como método de enucleação química de ovócitos bovinos maturados *in vitro*, avaliando possíveis efeitos na maturação e a possibilidade de produzir embriões oriundos de TN.

HIPÓTESE

A actinomicina D é eficaz para enuclear ovócitos bovinos maturados *in vitro*, não apresentando efeito na MIV, sendo possível obter embriões clonados a partir destes ovócitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGUISI, A.; OVERSTROM, E. W. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. **Theriogenology**, v. 54, p. 209, 2000.

BARTON, S. C.; SURANI, M. A.; NORRIS, M. L. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. **Nature**, v. 311, n. 5984, p. 374-376, 1984.

BAYONA-BAFALUY, M. P.; MANFREDI, G.; MORAES, C. T. A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to rho(o) cells. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 16, p. e98, 2003.

BAYONA-BAFALUY, M. P.; MULLER, S.; MORAES, C. T. Fast adaptive coevolution of nuclear and mitochondrial subunits of ATP synthetase in orangutan. **Mol Biol Evol**, v. 22, n. 3, p. 716-724, 2005.

BORDIGNON, V.; SMITH, L. C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. **Mol Reprod Dev**, v. 49, n. 1, p. 29-36, 1998.

BORDIGNON, V.; SMITH, L. C. Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. **Biol Reprod**, v. 61, n. 6, p. 1513-1520, 1999.

BORDIGNON, V.; KEYSTON, R.; LAZARIS, A., et al. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells. **Biol Reprod**, v. 68, n. 6, p. 2013-2023, 2003.

BOUSQUET, D.; BLONDIN, P. Potential uses of cloning in breeding schemes: dairy cattle. **Cloning Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 190-197, 2004.

BRIGGS, R.; KING, T. J. Transplantation of Living Nuclei from Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 38, n. 5, p. 455-463, 1952.

BROMHALL, J. D. Nuclear transplantation in the rabbit egg. **Nature**, v. 258, n. 5537, p. 719-722, 1975.

BROPHY, B.; SMOLENSKI, G.; WHEELER, T., et al. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 2, p. 157-162, 2003.

DOMINKO, T.; CHAN, A.; SIMERLY, C., et al. Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. **Biol Reprod**, v. 62, n. 1, p. 150-154, 2000.

EAKIN, G. S.; BEHRINGER, R. R. Tetraploid development in the mouse. **Dev Dyn**, v. 228, n. 4, p. 751-766, 2003.

EAKIN, G. S.; HADJANTONAKIS, A. K.; PAPAIOANNOU, V. E., et al. Developmental potential and behavior of tetraploid cells in the mouse embryo. **Dev Biol**, v. 288, n. 1, p. 150-159, 2005.

EGGAN, K.; BALDWIN, K.; TACKETT, M., et al. Mice cloned from olfactory sensory neurons. **Nature**, v. 428, n. 6978, p. 44-49, 2004.

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

FULKA, J. JR.; MOOR, R. M. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 34, n. 4, p. 427-430, 1993.

FULKA, J. JR.; LOI, P.; FULKA, H., et al. Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. **Trends Biotechnol**, v. 22, n. 6, p. 279-283, 2004.

GASPARRINI, B.; GAO, S.; AINSLIE, A., et al. Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. **Biol Reprod**, v. 68, n. 4, p. 1259-1266, 2003.

GOLDBERG, I. H.; RABINOWITZ, M.; REICH, E. Basis of actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 48, p. 2094-2101, 1962.

GURDON, J. B. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 22, p. 1-22, 2006.

HIKAWA, N.; TAKENAKA, T. Improved method for producing neuronal hybrids using emetine and actinomycin D. **Brain Res**, v. 734, n. 1-2, p. 345-348, 1996.

HIKAWA, N.; TAKENAKA, T. Method for production of neuronal hybridoma using emetine and actinomycin D. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 1, n. 3, p. 224-226, 1997.

HOCHEDLINGER, K.; BLELLOCH, R.; BRENNAN, C., et al. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. **Genes Dev**, v. 18, n. 15, p. 1875-1885, 2004.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1061-1067, 2006.

HOLT, W. V.; PICKARD, A. R.; PRATHER, R. S. Wildlife conservation and reproductive cloning. **Reproduction**, v. 127, n. 3, p. 317-324, 2004.

HOPPE, P. C.; ILLMENSEE, K. Microsurgically produced homozygous-diploid uniparental mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5657-5661, 1977.

IBANEZ, E.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTROM, E. W. Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell-cycle egress, kinetics

of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. **Biol Reprod**, v. 68, n. 4, p. 1249-1258, 2003.

ILLMENSEE, K.; HOPPE, P. C. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell**, v. 23, n. 1, p. 9-18, 1981.

JAGIELLO, G. M. Meiosis and inhibition of ovulation in mouse eggs treated with actinomycin D. **J Cell Biol**, v. 42, n. 2, p. 571-574, 1969.

KAWAKAMI, M.; TANI, T.; YABUUCHI, A., et al. Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes. **Cloning Stem Cells**, v. 5, n. 4, p. 379-387, 2003.

KIM, T. M.; HWANG, W. S.; SHIN, J. H., et al. Development of a nonmechanical enucleation method using x-ray irradiation in somatic cell nuclear transfer. **Fertil Steril**, v. 82, n. 4, p. 963-965, 2004.

KORZH, V.; STRAHLE, U. Marshall Barber and the century of microinjection: from cloning of bacteria to cloning of everything. **Differentiation**, v. 70, n. 6, p. 221-226, 2002.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends Biotechnol**, v. 22, n. 6, p. 286-294, 2004.

KUROIWA, Y.; KASINATHAN, P.; CHOI, Y. J., et al. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. **Nat Biotechnol**, v. 20, n. 9, p. 889-894, 2002.

KUROIWA, Y.; KASINATHAN, P.; MATSUSHITA, H., et al. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. **Nat Genet**, v. 36, n. 7, p. 775-780, 2004.

LI, J.; ISHII, T.; FEINSTEIN, P., et al. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. **Nature**, v. 428, n. 6981, p. 393-399, 2004a.

LI, G. P.; WHITE, K. L.; BUNCH, T. D. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. **Cloning Stem Cells**, v. 6, n. 1, p. 5-13, 2004b.

LIU, L.; OLDENBOURG, R.; TRIMARCHI, J. R., et al. A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. **Nat Biotechnol**, v. 18, n. 2, p. 223-225, 2000.

LIU, J. L.; SUNG, L. Y.; BARBER, M., et al. Hypertonic medium treatment for localization of nuclear material in bovine metaphase II oocytes. **Biol Reprod**, v. 66, n. 5, p. 1342-1349, 2002.

LOI, P.; PTAK, G.; BARBONI, B., et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. **Nat Biotechnol**, v. 19, n. 10, p. 962-964, 2001.

MCGRATH, J.; SOLTER, D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. **Science**, v. 220, n. 4603, p. 1300-1302, 1983.

MCGRATH, J.; SOLTER, D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. **Science**, v. 226, n. 4680, p. 1317-1319, 1984.

MELO, E. O.; SOUSA, R. V.; IGUMA, L. T., et al. Isolation of transfected fibroblast clones for use in nuclear transfer and transgene detection in cattle embryos. **Genet Mol Res**, v. 4, n. 4, p. 812-821, 2005.

MITALIPOV, S. M.; WHITE, K. L.; FARRAR, V. R., et al. Development of nuclear transfer and parthenogenetic rabbit embryos activated with inositol 1,4,5-trisphosphate. **Biol Reprod**, v. 60, n. 4, p. 821-827, 1999.

MODLINSKI, J. A. Transfer of embryonic nuclei to fertilised mouse eggs and development of tetraploid blastocysts. **Nature**, v. 273, n. 5662, p. 466-467, 1978.

MOURA, M. T.; MELO, A. H.; TEIXEIRA, Á. A. C.; et al., Uso de Diferentes métodos de coloração para a identificação de células epiteliais no sêmen bovino. **III Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 2003, Recife PE, 2003.

MOURA, M. T.; MUNDIM, T. C. D.; SOUSA, R. V., et al. Expressão diferencial dos genes imprinted IGF2R e GRB10 em embriões clones bovinos produzidos por transferência nuclear. **Anais do 52º Congresso Brasileiro de Genética**. p. 269, 2006a.

MOURA, M. T.; MUNDIM, T. C. D.; DODE, M. A., et al. Análise da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo em embriões clones e partenogênicos bovinos. **Anais do 52º Congresso Brasileiro de Genética**. p. 270, 2006b.

NAGY, A.; ROSSANT, J.; NAGY, R., et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 18, p. 8424-8428, 1993.

NOUR, M. S.; TAKAHASHI, Y. Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 51, n. 3, p. 661-666, 1999.

OSADA, T.; YAGI, T. Neuronal genomics using mouse cloning with the single neuronal nucleus. **Current Genomics**, v. 7, p. 217-225, 2006.

PANG, Y.; GE, W. Activin stimulation of zebrafish oocyte maturation in vitro and its potential role in mediating gonadotropin-induced oocyte maturation. **Biol Reprod**, v. 61, n. 4, p. 987-992, 1999.

PHELPS, C. J.; KOIKE, C.; VAUGHT, T. D., et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. **Science**, v. 299, n. 5605, p. 411-414, 2003.

PIVKO, J.; GRAFANAU, P.; KUBOVICOVA, E. Bovine abnormal preimplantation embryos: analysis of segregated cells occurring in the subzonal space and/or blastocoele cavity for their nuclear morphology and persistence of RNA synthesis. **Zygote**, v. 10, n. 2, p. 141-147, 2002.

PRATHER, R. S.; BARNES, F. L.; SIMS, M. M., et al. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biol Reprod**, v. 37, n. 4, p. 859-866, 1987.

SAVARD, C.; NOVAK, S.; SAINT-CYR, A., et al. Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 67, n. 1, p. 70-76, 2004.

SCHNIEKE, A. E.; KIND, A. J.; RITCHIE, W. A., et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v. 278, n. 5346, p. 2130-2133, 1997.

SIMERLY, C.; DOMINKO, T.; NAVARA, C., et al. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 297, 2003.

SMITH, L. C. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. **J Reprod Fertil**, v. 99, n. 1, p. 39-44, 1993.

SMITH, L. C., WILMUT, I., 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. **Biol Reprod**, 40, 1027-1035.

SOBELL, H. M. Actinomycin and DNA transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 16, p. 5328-5331, 1985.

SOLTER, D. Mammalian cloning: advances and limitations. **Nat Rev Genet**, v. 1, n. 3, p. 199-207, 2000.

SULLIVAN, E. J.; KASINATHAN, S.; KASINATHAN, P., et al. Cloned calves from chromatin remodeled in vitro. **Biol Reprod**, v. 70, n. 1, p. 146-153, 2004.

TANI, T.; SHIMADA, H.; KATO, Y., et al. Demecolcine-assisted enucleation for bovine cloning. **Cloning Stem Cells**, v. 8, n. 1, p. 61-66, 2006.

TATHAM, B. G.; DOWSING, A. T.; TROUNSON, A. O. Enucleation by centrifugation of in vitro-matured bovine oocytes for use in nuclear transfer. **Biol Reprod**, v. 53, n. 5, p. 1088-1094, 1995.

TRASK, D. K.; MULLER, M. T. Stabilization of type I topoisomerase-DNA covalent complexes by actinomycin D. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 5, p. 1417-1421, 1988.

VAJTA, G.; PEURA, T. T.; HOLM, P., et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. **Mol Reprod Dev**, v. 55, n. 3, p. 256-264, 2000.

VAJTA, G.; LEWIS, I. M.; HYTTEL, P., et al. Somatic cell cloning without micromanipulators. **Cloning**, v. 3, n. 2, p. 89-95, 2001.

WAGONER, E. J.; ROSENKRANS, C. F., JR.; GLIEDT, D. W., et al. Functional enucleation of bovine oocytes: Effects of centrifugation and ultraviolet light. **Theriogenology**, v. 46, n. 2, p. 279-284, 1996.

WANG, M. K.; LIU, J. L.; LI, G. P., et al. Sucrose pretreatment for enucleation: an efficient and non-damage method for removing the spindle of the mouse MII oocyte. **Mol Reprod Dev**, v. 58, n. 4, p. 432-436, 2001.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R., et al. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. **Reprod Fertil Dev**, v. 10, n. 4, p. 369-378, 1998.

WESTHUSIN, M. E.; LEVANDUSKI, M. J.; SCARBOROUGH, R., et al. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cows. **J Reprod Fertil**, v. 95, n. 2, p. 475-480, 1992.

WESTHUSIN, M. E.; COLLAS, P.; MAREK, D., et al. Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality but not quantity of embryos produced by in vitro fertilization and nuclear transplantation. **Theriogenology**, v. 46, n. 2, p. 243-252, 1996.

WESTHUSIN, M. E.; LONG, C. R.; SHIN, T., et al. Cloning to reproduce desired genotypes. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 35-49, 2001.

WILLADSEN, S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, v. 320, n. 6057, p. 63-65, 1986.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J., et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-813, 1997.

YANG, X.; SMITH, S. L.; TIAN, X. C., et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nat Genet**, v. 39, n. 3, p. 295-302, 2007.

YIN, X. J.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effect of enucleation procedures and maturation conditions on the development of nuclear-transferred rabbit oocytes receiving male fibroblast cells. **Reproduction**, v. 124, n. 1, p. 41-47, 2002.

CAPÍTULO ÚNICO

UTILIZAÇÃO DA ACTINOMICINA D COMO MÉTODO DE ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OVÓCITOS BOVINOS DESTINADOS À TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

UTILIZAÇÃO DA ACTINOMICINA D COMO MÉTODO DE ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OVÓCITOS BOVINOS DESTINADOS A TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

Resumo

A clonagem por Transferência Nuclear (TN) é uma técnica pouco eficiente e laboriosa. O processo, do ponto de vista técnico, é um dos principais fatores responsáveis pela quantidade e qualidade dos embriões produzidos. A enucleação é a etapa mais agressiva da TN. Apesar dos métodos alternativos propostos, a enucleação permanece sendo realizada como inicialmente descrita nos anos 50. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do inibidor irreversível de transcrição e replicação actinomicina D (Fluka[®], Suíça) como método de enucleação química de ovócitos. Ovócitos foram maturados *in vitro* (MIV) por 4 ou 6 horas e expostos a Actinomicina D (T1, controle; T2 = 1,0 µg ml⁻¹ / 16hs; T3 = 1,0 µg ml⁻¹ / 14hs; T4 = 2,5 µg ml⁻¹ / 14hs; T5 = 5,0 µg ml⁻¹ / 14hs). Os ovócitos foram desnudados após 20 horas de MIV e ativados com 24-26 horas de MIV. As taxas de clivagem foram avaliadas 48 horas após a ativação (D2) e as de blastocisto após 168 (D7) e 192 (D8) horas de cultivo. Parte dos ovócitos foi fixada e corada com lacmóide ou orceína para determinação da fase da meiose ou para visualização da morfologia dos cromossomos, respectivamente. Posteriormente, ovócitos tratados com actinomicina D foram utilizados para clonagem por TN, sendo que parte dos embriões (D3) foi fixada para avaliar o percentual de células apoptóticas através do teste de TUNEL. Os dados relativos às taxas de maturação, clivagem e blastocisto foram analisados pelo teste do Qui-quadrado e os percentuais de apoptose pelo teste de Mann-Whitney. A taxa de maturação (T1 = 90,4%; T2 = 82,3%; T3 = 79,1%; T4 = 83,4%; T5 = 74,7%), clivagem (T1 = 68,9%; T2 = 46,0%; T3 = 49,7%; T4 = 33,4%; T5 = 29,3%) e de blastocisto em D8 (T1 = 41,1%; T2 = 1,4%; T3 = 1,3%; T4 = 0,9%; T5 = 0,0%) após o tratamento com actinomicina D foi significativamente menor. Dos ovócitos fixados, 63,2% estavam em metáfase II (MII). Ao avaliar os cromossomos, foi observada uma descondensação significativa com as concentrações mais altas (2,5 e 5,0 µg ml⁻¹). Os demais tratamentos não apresentaram modificações perceptíveis. Ovócitos tratados com 1,0 µg ml⁻¹ por 14 horas foram utilizados como citoplasmas receptores. A taxa de clivagem dos embriões reconstruídos (61,3%) foi

semelhante ao grupo partenogênético tratado (61,3%) e inferior ao não tratado com actinomicina D (70,2%), embora a taxa de blastocisto tenha sido mais alta no grupo de TN (11,8%) em relação ao controle tratado (3,6%) e inferior ao controle sem tratamento (38,0%). Ao analisar o índice apoptótico dos embriões, os embriões partenogênicos tratados tiveram um índice maior que os partenogênicos não tratados (24,2% contra 4,8%). No entanto, os embriões oriundos de TN com ovócito tratado não foram diferentes estatisticamente dos TN controle (9,3 contra 13,0%). A actinomicina D é eficiente no bloqueio da transcrição e replicação embrionária. Além disso, foi possível obter embriões reconstruídos que apresentavam percentual de células apoptóticas indistinguível do controle.

Palavras-chave: Bovino, Ovócito, Enucleação, Actinomicina D e Transferência Nuclear.

USE OF ACTINOMYCIN D AS A CHEMICAL ENUCLEATION METHOD OF BOVINE OOCYTES DESTINED FOR NUCLEAR TRANSFER

Abstract

Cloning by Nuclear Transfer (NT) is a low efficiency and labor intense technique. The process, in technical terms, is one of the main factors responsible for both embryo quality and quantity. Enucleation is the most aggressive step. Although alternative methods have been proposed, it remains mainly as it has been first described in the early fifties. The objective of the present work was to evaluate the effect of transcription and replication inhibitor actinomycin D as a chemical enucleation method for oocytes. Oocytes were matured in vitro (MIV) for 4 or 6 hours and exposed to actinomycin D (T1, control; T2 = 1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ / 16hs; T3 = 1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ / 14hs; T4 = 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ / 14hs; T5 = 5,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ / 14hs). The oocytes were denuded 20 hours after MIV and activated 24-26 hours after MIV. The cleavage rate was recorded 48 hours post activation and the blastocyst at 168 (D7) and 192 (D8) hours of culture. Some oocytes were fixed and stained with lacmoyd or orcein to determine the maturation status or for chromosome morphology evaluation, respectively. Furthermore, oocytes treated with actinomycin D were used as recipient cytoplasts for NT, while some embryos (D3) were fixed to evaluate the percentage of apoptotic nuclei by the TUNEL assay. The data relative to the maturation, cleavage and blastocyst rate were analyzed by the chi-square test and apoptosis percentages by the Mann-Whitney test. The maturation (T1 = 90,4%; T2 = 82,3%; T3 = 79,1%; T4 = 83,4%; T5 = 74,7%), cleavage (T1 = 68,9%; T2 = 46,0%; T3 = 49,7%; T4 = 33,4%; T5 = 29,3%) and blastocyst rate at D8 (T1 = 41,1%; T2 = 1,4%; T3 = 1,3%; T4 = 0,9%; T5 = 0,0%) after actinomycin D treatment was significantly different. Analyzing the fixed oocytes, 63,2% were in MII. While evaluating the chromosomes, it was observed a significant uncoiling when exposed to higher concentrations (2,5 and 5,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$). The remaining groups had no apparent perceptible modifications. Furthermore, oocytes treated with 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for 14 hours were used as recipient cytoplasts. The cleavage rate (61,3%) was similar to the actinomycin D treated control group (61,3%) and lower than the non-treated control (70,2%), although the blastocyst rate was higher in the NT group (11,8%) comparing to the treated control (3,6%) and lower to the untreated control (38,0%). After analyzing the embryos for

apoptotic cells, the treated parthenogenetic embryos had a higher index than the parthenogenetic control (24,2% vs. 4,8%). However, the NT embryos generated by treated cytoplasts wasn't statistically different from the NT control (9,3 vs. 13,0%). The actinomycin D treatment is efficient to block embryonic transcription and replication. Moreover, it was possible to obtain reconstructed embryos that possess an apoptotic cell index indistinguishable from the control.

Key words: Bovine, Oocyte, Enucleation, Actinomycin D and Nuclear Transfer.

INTRODUÇÃO

A técnica de TN permite expor o núcleo de uma célula diferenciada ao citoplasma de um ovócito. Esta interação permite a reversão dos mecanismos que controlam o fenótipo celular, permitindo gerar células que são capazes de recapitular o desenvolvimento *in vivo* (Hochedlinger e Jaenisch, 2006; Wilmut et al., 1997).

Do ponto de vista científico, a técnica tem grande potencial por apresentar duas importantes propriedades: produção de animais a partir de uma única célula e a reversão global dos mecanismos epigenéticos. A partir destas particularidades, autores utilizaram a TN a partir de neurônios sensitivos olfatórios para comprovar que a escolha dos seus receptores é regulada por mecanismos epigenéticos, sem apresentar alterações genômicas (Eggan et al., 2004; Li et al., 2004a). Além disso, foi demonstrada funcionalmente a participação das alterações epigenéticas na determinação do melanoma (Hochedlinger et al., 2004). A contribuição das alterações genéticas na especialização dos neurônios foi também avaliada pela TN (Osada e Yagi, 2006). A clonagem permanece hoje como uma ferramenta para distinguir mecanismos genéticos dos epigenéticos (Hochedlinger e Jaenisch, 2006) e a sua popularização está estreitamente relacionada ao aumento de sua eficiência.

Para conservação de recursos genéticos, a replicação de genótipos raros permitiria aumentar a chance de preservar raças (Wells et al., 1998; Moura et al., 2003) ou espécies (Loi et al., 2001), reduzindo a perda de alelos, embora haja muita controvérsia sobre este estratégia, inclusive dentro da comunidade científica (Holt et al., 2004).

Suas aplicações comerciais são bem diversas. Replicação de genótipos de animais de alto mérito genético (Westhusin et al., 2001), com maior resistência a doenças (Westhusin et al., 2001), aumento da disseminação de genes em diferentes condições de produção e da confiabilidade dos testes de progênie (Bousquet e Blondin, 2004). Associada à transgênese (Melo et al., 2005), aumenta a eficiência de produção deste tipo de animal (Schnieke et al., 1997; Brophy et al., 2003; Kues e Niemann, 2004), permitindo produzir, órgãos para xenotransplante (Phelps et al.,

2003), animais mais produtivos (Brophy, et al., 2003) e proteínas exógenas de interesse comercial com maior eficiência (Kuroiwa et al., 2002; Kuroiwa et al., 2004).

Apesar do seu potencial científico e comercial, a clonagem por TN permanece como uma técnica pouco eficiente e laboriosa. Esta ineficiência se deve a vários fatores, como por exemplo, expressão gênica aberrante (Moura et al., 2006a, 2006b). Independentemente, parte é devido a aspectos técnicos.

A produção dos embriões clonados é realizada através da micromanipulação dos ovócitos. A eficiência de produção dos embriões é essencialmente dependente dos aspectos relacionados a micromanipulação. É um processo demorado e delicado. Por isso, o seu aperfeiçoamento será obtido através da redução do tempo requerido e das agressões as quais as células são submetidas.

A enucleação é a etapa mais agressiva da técnica, tendo grande impacto na eficiência final. Sua simplificação terá grande impacto na produção de embriões reconstruídos. Por isso, diversos métodos alternativos foram descritos na literatura (Li et al., 2004b). Todos eles tinham como objetivo simplificar o processo e ampliar o número de estruturas viáveis para reconstrução. No entanto, estes métodos falharam, não existindo no momento alternativas ao método tradicional de remoção do DNA de forma mecânica.

A utilização de inibidores irreversíveis de replicação e/ou transcrição seria uma alternativa aos métodos químicos, por não depender da ativação do gameta para o sucesso da enucleação (fator que reduz o potencial de desenvolvimento dos embriões reconstruídos). Esta vantagem motivou a testar a actinomicina D, um inibidor de transcrição e replicação com método de inibição do DNA do ovócito, sem haver a necessidade de removê-lo.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com actinomicina D em ovócitos e investigar se é possível produzir embriões reconstruídos com células somáticas a partir deste tipo de citoplasma.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos ovários e seleção dos ovócitos

Ovários obtidos de abatedouro foram coletados na região do entorno de Brasília/DF. Após a coleta, foram transportados em solução fisiológica (0,9% de NaCl) a uma temperatura de 35°C para o laboratório. Ovócitos foram recuperados dos folículos através de um sistema de bomba a vácuo utilizando escalpes de 19G acoplados a tubos cônicos de 15ml (TPP®). Estes eram mantidos parcialmente imersos em banho maria com temperatura de 35°C por pelo menos dez minutos, para haver a sedimentação do material. Apenas folículos com diâmetro entre 2 e 8 milímetros foram aspirados. O pellet de cada tubo era diluído em meio de lavagem (LAV), composto por TCM-199 Hank's com Hapes ou PBS suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB - Invitrogen/Gibco®), 10 UI/ml de penicilina (Sigma®) e 50 µg/ml de estreptomicina (Sigma®). A procura dos ovócitos foi feita em placa de *petri* de 100mm (TPP®), sob estereomicroscópio (ZEISS® - Stemi SV6). Após a recuperação, os ovócitos foram selecionados e apenas os complexos *cumulus*-ovócito (CCO) que apresentavam três ou mais camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram submetidos à maturação *in vitro*.

Maturação *in vitro* dos ovócitos

Os CCOs selecionados foram imediatamente lavados em meio para MIV. A maturação era feita em placa de 35mm (TPP®) contendo 1,5 ml de meio MIV coberto com óleo de silicone (Sigma®). O meio de maturação (Nutricell®) é composto de TCM-199 com sais de Earle's suplementado com 10% de SFB, L-glutamina, Hormônio Folículo Estimulante (FSH), Hormônio Luteinizante (LH), 10 UI ml⁻¹ de penicilina e 50 µg ml⁻¹ de estreptomicina, sendo estabilizado por duas horas em incubadora a 39°C e 5% de dióxido de carbono (CO₂) em ar, onde se realizou a maturação. Em seguida, os CCOs permaneceram no meio de maturação por quatro a seis horas antes de serem submetidos aos tratamentos. Posteriormente, os ovócitos foram divididos pela quantidade de grupos experimentais. Os ovócitos eram novamente lavados agora utilizando o meio destinado a cada tratamento, sendo novamente postos em incubadora por um período de 14-16 horas.

Bloqueio da transcrição e replicação por actinomicina D

O agente utilizado como inibidor irreversível da transcrição e replicação foi a actinomicina D (Fluka®). Baseando-se em relatos anteriores utilizando o reagente, foram utilizados cinco tratamentos: Grupo I (controle, sem exposição ao reagente), Grupo II (1 µg ml⁻¹ por 14 horas), Grupo III (1 µg ml⁻¹ por 16 horas), grupo IV (2,5 µg ml⁻¹ por 14 horas) e Grupo V (5,0 µg ml⁻¹ por 14 horas). Os grupos que tiveram 14 horas tiveram o período de exposição da 6^a a 20^a hora de MIV e o grupo de 16 horas teve o período da 4^a a 20^a hora de MIV. Após 20 horas de MIV, todos os grupos foram lavados em meio para MIV e permaneceram na incubadora até serem desnudados.

Desnudação, quantificação da maturação e ativação dos ovócitos

Após a maturação, os ovócitos foram desnudados utilizando hialuronidase (Sigma®) 0,2% por cinco minutos. Imediatamente foram transferidos para outra gota do mesmo reagente e submetidos a pipetagem pelo mesmo período. Posteriormente, mais cinco minutos de pipetagem em LAV. Após remover as células do *cumulus*, os gametas retornaram para o meio MIV até completar 24 horas de maturação. Os ovócitos que se apresentavam degenerados após a desnudação eram descartados.

Com 24 horas de maturação, os ovócitos foram avaliados pela presença do primeiro CP sob estereomicroscópio (ZEISS® - Stemi SV11) e classificados como em MII ou imaturos. Em seguida, os ovócitos de cada tratamento foram submetidos à ativação partenogénica utilizando ionomicina a 5µM (Sigma®) por cinco minutos em meio para cultivo (Holm et al., 1999). Este era composto de SOF suplementado com aminoácidos essenciais, tri-citrato de sódio, myo-inositol e 5% de SFB (SOFaaci). Como complemento da ativação, os ovócitos foram posteriormente lavados em SOFaaci e imediatamente cultivados em 2mM de 6-dimethylaminopurine (6DMAP - Sigma®) em SOFaaci por 4-5 horas. Após o 6DMAP, os ovócitos foram novamente lavados em SOFaaci e cultivados por oito dias em incubadora a 39°C e 5% de CO₂ em ar.

Citogenética

Ovócitos com CP destinados à análise do cariótipo foram retirados da maturação e lavados em PBS com 10% SFB e antibióticos. Em seguida, grupos de cinco até nove ovócitos foram depositados em uma solução de citrato de sódio a 0,9% (Sigma®) por cinco minutos. Posteriormente foram transferidos para uma lâmina histológica com o mínimo de meio possível, retirando-se o excedente. Uma gota do primeiro fixador, contendo a proporção de 2:1 Metanol / Ácido Acético foi depositada sobre os ovócitos. Após a remoção do excesso e início da expansão das células, estilou-se uma segunda gota. Novamente retirou-se o excesso e pingou-se uma gota do segundo fixador, com os mesmos reagentes, mas na proporção de 3:1, respectivamente. Após a secagem das lâminas, elas foram imersas no segundo fixador por cerca de 24 horas em temperatura ambiente.

Terminada a fixação, as lâminas foram secadas e coradas com orceína (Sigma®) a 1% por dois minutos. Retirou-se o corante das lâminas com água corrente, as quais foram novamente secadas e marcadas nos locais onde se apresentam os ovócitos.

A montagem das lâminas consistiu na deposição de uma gota de óleo de imersão e deposição de uma lamínula sobre o local demarcado. Para vedar e melhor preservar a lâmina, as bordas da lamínula foram cobertas com esmalte.

A análise da morfologia dos cromossomos foi feita sob microscópio óptico com aumento de 1000x.

Os ovócitos considerados imaturos pela ausência de CP foram separados e fixados em uma solução contendo 2:1 Etanol / Ácido Acético por pelo menos 24 horas. Após a fixação, os ovócitos foram colocados em uma lâmina com o mínimo possível de fixador, cobertos com uma lamínula e corados com uma solução de Lacmóide (Sigma®) a 2%. Posteriormente, as estruturas foram lavadas com fixador, vedou-se à lâmina com esmalte e analisou-se a fase da meiose sob óleo de imersão sob microscópio óptico com aumento de 1000x.

Cultivo de células somáticas

Uma palheta de 0,5 ml de fibroblastos de uma fêmea bovina adulta foi retirada do nitrogênio líquido (-196° C) e descongelada em recipiente contendo água aquecida a 37-38°C. O conteúdo da palheta foi depositado em um tubo cônico de 15ml (TPP®). O tubo continha 5 ml meio de cultivo celular composto por Dubelcco's Minimum Eagle's Medium (DMEM - GIBCO®) suplementado com bicarbonato de sódio, ácido pirúvico, 10% SFB e antibióticos. O conteúdo foi centrifugado com o objetivo de separar as células do meio contendo Dimetil Sulfóxido (DMSO - Sigma®). Retirado o sobrenadante, o pellet era resuspendido com 200µl de meio de cultivo e dividido em duas frações. Cada fração era depositada em uma garrafa de cultivo celular de 25cm² e acrescido de 3 ml de meio. O cultivo era realizado em incubadora a 39°C e 5% de CO₂ em ar.

A cada três dias, as placas eram avaliadas quanto ao seu desenvolvimento, morfologia celular e possível contaminação. Concomitantemente, o meio era trocado. Quando atingiam confluência, aproximadamente a cada sete dias, as placa eram repicadas ou mantidas para TN, quando o cultivo deveria estar em confluência.

Transferência Nuclear

Ovócitos foram maturados e desnudados como descrito acima. Apenas ovócitos que apresentavam granulação citoplasmática homogênea e o primeiro CP foram utilizados. Antes da micromanipulação, os gametas foram incubados em solução apresentando 7,5 µg ml⁻¹ de citocalasina D (Sigma®) 10 µg ml⁻¹ hoechst 33342 (Sigma®) por quinze minutos. Foram utilizados grupos de 16-20 ovócitos.

Para avaliação do desenvolvimento in vitro, foram utilizados três grupos: Partenogenético não tratado (P0, P controle); Partenogenético Tratado (P1, 1, 0 µg ml⁻¹/14 hs) e TN com ovócito tratado (TN1, 1, 0 µg ml⁻¹/14 hs). Nas réplicas onde foi realizado o teste de TUNEL, mais um grupo foi incluído, onde ovócitos não tratados foram usados para TN (TN0, TN controle).

Individualmente, os ovócitos eram presos à pipeta holding e posicionava-se o CP na posição de 4 horas. Em seguida, introduzia-se a pipeta de injeção e cuidadosamente retirava-se o CP sem remover citoplasma se possível. Freqüentemente, uma mínima fração do citoplasma era removida. Imediatamente, uma célula somática era depositada no espaço perivitelino através do mesmo furo na zona pelúcida e cuidadosamente aderida ao citoplasma do ovócito.

Para produção das estruturas destinadas à avaliação de apoptose, todos os ovócitos foram devidamente enucleados, inclusive os tratados. Esta medida teve como objetivo de excluir a possibilidade de contabilizar o DNA do ovócito como um blastômero oriundo da célula somática, causando um possível viés no total de blastômeros apoptóticos.

Terminada a fase de reconstrução, as estruturas eram submetidas a eletrofusão. Foi utilizada uma placa de fusão de 500 μ m e um eletrofusor ECM 200 (BTX[®]), com dois pulsos de 1.99 Kva, com 30 μ s de duração. Como solução para realização da eletrofusão, foi utilizado o Mannitol a 0,28M (Sigma[®]). Após a realização da primeira fusão de todas as estruturas, esperava-se trinta minutos para avaliar o resultado do procedimento. Todos os ovócitos não fusionados foram submetidos a uma segunda fusão. Todas as estruturas não fusionadas foram descartadas.

Imediatamente após o início da eletrofusão, esperava-se um intervalo de três horas, onde as estruturas fusionadas eram cultivadas em SOFaaci em estufa. Após este período, os mesmos eram submetidos à ativação partenogenética como descrito acima.

Sistema de cultivo

Na véspera da micromanipulação, antes da chegada dos ovários, eram preparadas placas de 60mm (TPP[®]) com quatro gotas de 150-200 μ l cada de SOFaaci e cobertas com óleo mineral (Sigma[®]) e estabilizadas na incubadora de CO₂ por pelo menos duas horas.

Após a seleção dos ovócitos destinados à MIV, um pequeno grupo de ovócitos descartado foi submetido a pipetagem em LAV por um minuto. Em seguida, foram retirados da gota e o meio contendo as células era depositado em um eppendorf. Este era centrifugado por cinco minutos a 200 xg. O sobrenadante era removido e resuspendia-se o pellet com 200µl de SOFaaci. Posteriormente, 7µl da solução era depositados em cada gota da placa de cultivo.

No dia seguinte, após o início do cultivo com 6DMAP, era feita a troca de todo o meio presente nas gotas das placas de cultivo, permitindo a remoção de células que não se fixaram ao fundo da placa. Após a incubação das estruturas na solução com 6DMAP, os mesmos foram colocados nas gotas da placa de cultivo e retornaram a incubadora.

Teste de TUNEL

Embriões partenogênicos e reconstruídos foram fixados no terceiro dia de cultivo (D3), 64 horas após a ativação. Os embriões foram lavados em PBS e fixados em Paraformaldeído (Sigma[®]) a 4% por uma hora. Posteriormente, as estruturas foram permeabilizadas em solução 0,5% de Triton X-100 (Sigma[®]). Para obtenção de controles positivos, alguns embriões foram incubados com DNase I por uma hora em incubadora de CO₂. A próxima etapa consistia na incubação das estruturas na presença do KIT do TUNEL (Roche[®]), também por uma hora. Para obtenção de controles negativos, alguns embriões não foram expostos à enzima polimerase do KIT. Finalmente, os embriões eram incubados em solução contendo 10 µg ml⁻¹ hoechst 33342 (Sigma[®]) por dez minutos. Após cada etapa, foram realizadas lavagens em PBS. As lâminas eram montadas utilizando gotas de glicerol. Imediatamente, as lâminas eram avaliadas em microscópio de fluorescência Axiophot (Zeiss[®], Alemanha), com aumento de 400x.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1: Análise do desenvolvimento partenogenético de ovócitos após tratamento com actinomicina D.

No presente experimento foi avaliado o efeito do tratamento dos ovócitos sob diferentes concentrações de actinomicina D sobre a capacidade de maturação e posterior desenvolvimento embrionário partenogenético *in vitro*. Após 24 horas de MIV, foi feita a avaliação da maturação pela contagem de ovócitos com CP. O desenvolvimento embrionário foi avaliado nos dias D2, D7 e D8 (48, 168, 192 horas após a ativação, respectivamente). Foram realizadas nove réplicas.

Com o objetivo de confirmar os resultados obtidos inicialmente, os ovócitos que não apresentavam CP após 24 horas de maturação foram fixados. Através da coloração com lacmóide a 2%, foi possível determinar a fase da meiose em que o ovócito se encontrava. Utilizando esta estratégia consegue-se determinar o número de células que estão em MII mesmo sem apresentar CP. Foram realizadas três réplicas.

O experimento também foi realizado para analisar se o tratamento com actinomicina D causava alterações na morfologia dos cromossomos. Foram utilizados ovócitos em MII, classificados pela presença do CP. Foram fixados 16 ovócitos para cada um dos cinco tratamentos. A fixação dos ovócitos ocorreu após a hipotonização e posterior coloração com orceína acética a 2% (para visualização dos cromossomos). Foram realizadas três réplicas.

As duas etapas de fixação foram realizadas paralelamente. Como forma de controle das avaliações, ovócitos foram submetidos à ativação partenogenética e avaliados como no experimento 1.

Experimento 2: Produção de embriões oriundos de TN com células somáticas utilizando ovócitos enucleados com actinomicina D.

O experimento foi realizado para avaliar se é possível obter embriões clonados após o tratamento com actinomicina D. Os ovócitos após o tratamento, foram desnudados, selecionados pela presença do CP e tratados com citocalasina D. A reconstrução foi realizada através da remoção do CP e imediata deposição da célula somática no espaço perivitelino (Grupo TN1). Foram utilizados ovócitos não manipulados tratados com actinomicina D (P1) e outro grupo sem tratamento (P0) como controles do tratamento e do sistema de cultivo, respectivamente. Os três grupos foram ativados como descrito anteriormente após o término da manipulação de TN. O tratamento de actinomicina D utilizado foi $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ por 14 horas. Foram realizadas quatro réplicas.

Em decorrência dos dados obtidos nas réplicas acima, foi avaliado o percentual de células apoptóticas nos embriões partenogênicos ou oriundos de TN, tratados ou não com $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ de actinomicina D por 14 horas. Todos os embriões com dois ou mais blastômeros foram fixados 64 horas após a ativação (D3). Após a fixação, os embriões foram incubados com hoechst 33342 e o kit de TUNEL, para quantificação de núcleos com morfologia e reação ao TUNEL, respectivamente. Apenas os núcleos que apresentavam morfologia e reação positiva ao KIT foram considerados apoptóticos (M+T).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes às taxas de maturação, clivagem e blastocisto foram analisados pelo teste do Qui-quadrado (χ^2).

O teste de normalidade usado foi o Shapiro-Wilk/Stephens. Os dados obtidos no experimento 2 sobre o número médio de blastômeros e a análise de apoptose foram analisados pelos testes não paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, respectivamente. Foi utilizado o programa Prophet, versão 5.0, 1996.

O nível de significância considerado foi $P < 0,05$.

RESULTADOS

O experimento 1 teve como objetivo avaliar o efeito inibitório de diferentes tratamentos de actinomicina D em ovócitos bovinos maturados *in vitro*. O tratamento reduziu de forma significativa à taxa de maturação dos ovócitos ($p < 0,05$; Tabela 1). Em relação ao desenvolvimento embrionário, foi também observada uma redução significativa da clivagem. Apesar dos tratamentos reduzirem bastante a formação de blastocistos, apenas o tratamento com $5,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ impediu completamente o desenvolvimento até esta fase.

Tabela 1. Maturação e desenvolvimento embrionário partenogênético a partir de ovócitos submetidos a diferentes tratamentos de actinomicina D.

Tratamento ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	n	MII	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	
				D7	D8
0,0	386	349 (90,4) ^a	266 (68,9) ^a	144 (37,3) ^a	159 (41,1) ^a
1,0 (16)	356	293 (82,3) ^b	164 (46,0) ^b	4 (1,4) ^b	5 (1,8) ^b
1,0 (14)	379	300 (79,1) ^b	181 (49,7) ^b	5 (1,3) ^b	5 (1,3) ^b
2,5	206	172 (83,4) ^b	69 (33,4) ^c	1 (0,4) ^b	2 (0,9) ^b
5,0	194	145 (74,7) ^b	57 (29,3) ^c	0 (0,0) ^b	0 (0,0) ^b

Nove Réplicas. ^{a,b,c} Diferentes subscritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

A análise citogenética foi realizada para determinar se a diferença de eficiência da maturação se devia a não identificação da MII pela ausência de CP. Por isso, todos os ovócitos que não apresentavam CP foram fixados. Dentre os fixados, 63,2% estavam em MII (Figura 1), apresentando diferença expressiva entre os tratamentos (Tabela 2).

Figura 1. Ovócito em MII que não apresentava CP após 24 horas de MIV.

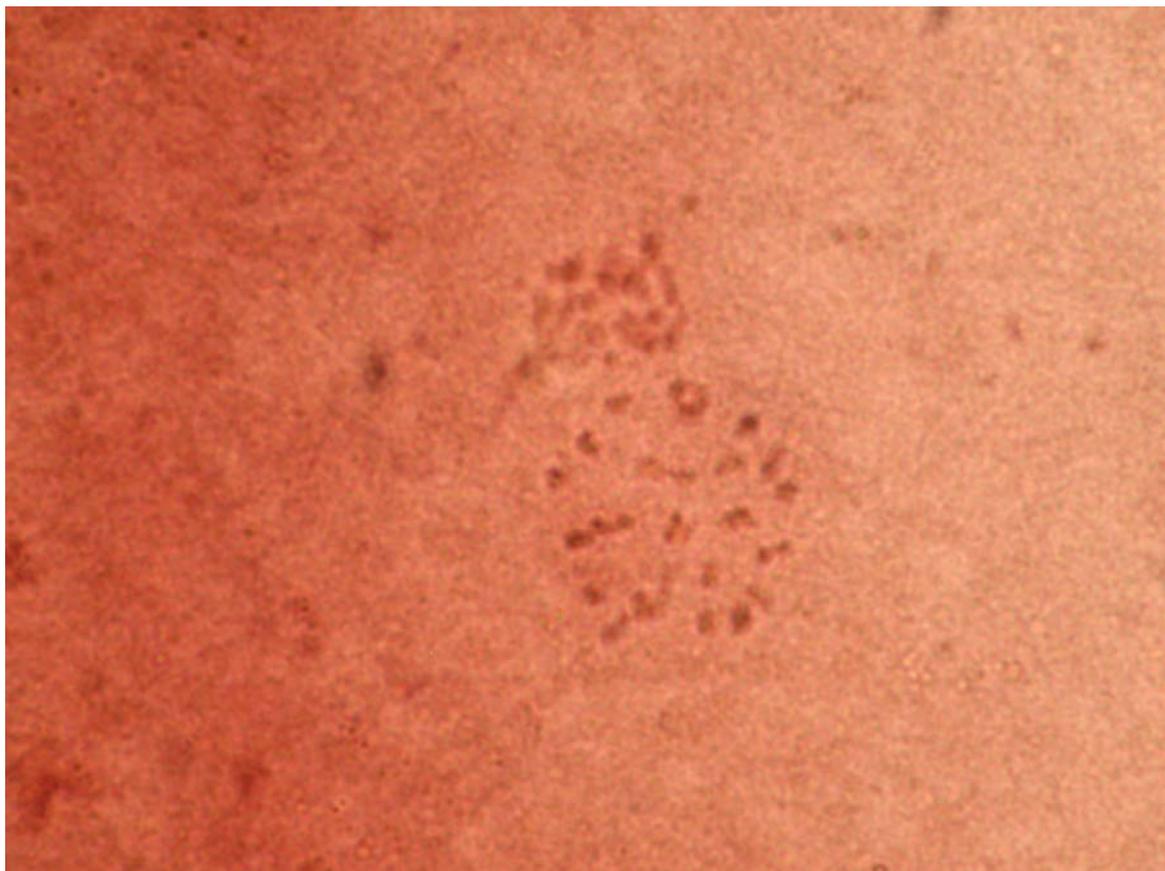


Tabela 2. Distribuição das fases da maturação dos ovócitos submetidos aos diferentes tratamentos de actinomicina D e que não apresentavam CP.

Tratamento ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	VG	PI	MI	AI	TI	MII
0,0	-	-	1	-	-	5
1,0 (16)	-	-	-	4	1	22
1,0 (14)	-	1	8	1	3	9
2,5	-	2	3	2	2	14
5,0	1	1	2	2	2	12
TOTAL	1	4	14	9	8	62

Três Réplicas. VG -Vesícula Germinativa; PI - Prófase I; MI - Metáfase I; Anáfase I; TI - Telófase I; MII - Metáfase II.

Apesar da inclusão dos dados obtidos através da fixação, não foi observada diferença nas taxas de maturação (Tabela 3), sendo observada uma redução da eficiência de maturação na presença de actinomicina D. Nesta segunda série de réplicas, porém, o tratamento de 1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ por 14 horas quando avaliado apenas pela presença do CP foi semelhante ao controle.

Tabela 3. Avaliação da maturação após a análise dos ovócitos tratados com actinomicina D que não apresentavam CP.

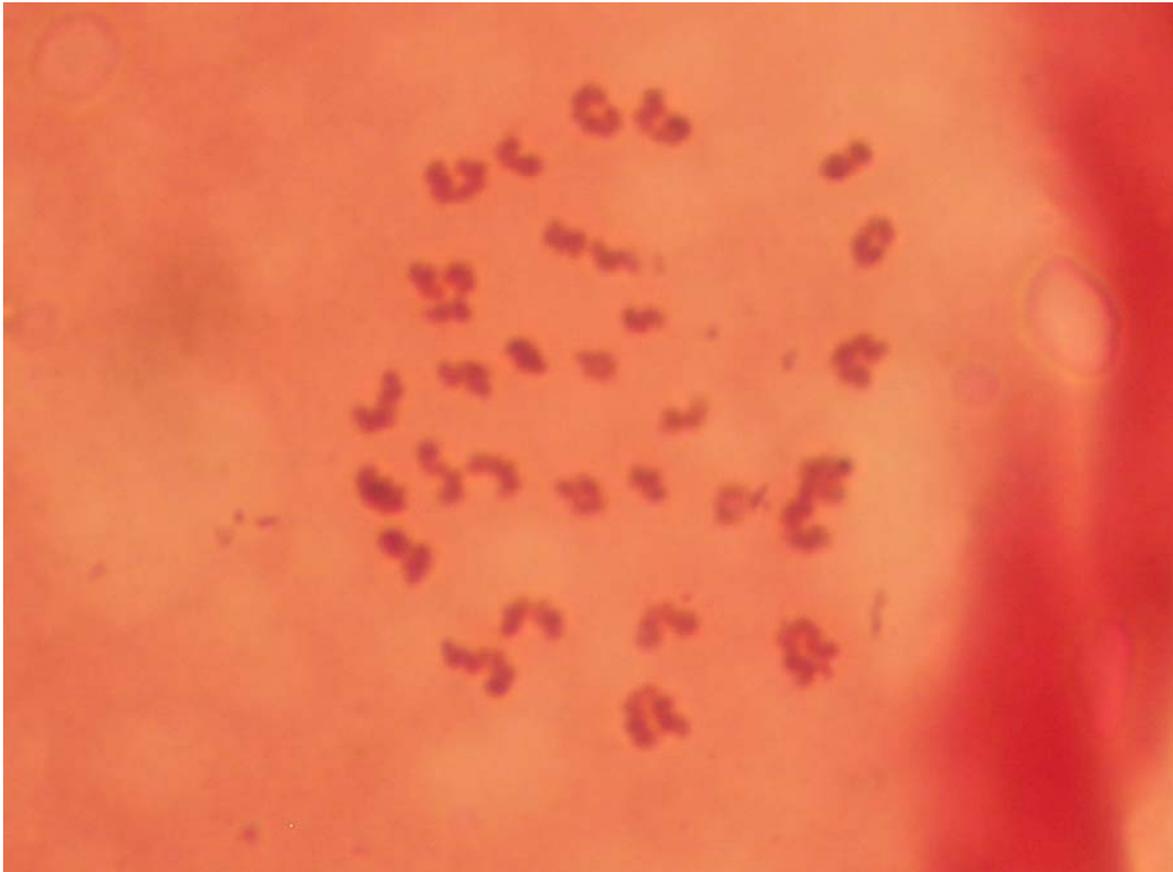
Tratamento ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Maturação (%)	
	C/ CP	CP + Fixação
0,0	122/140 (87,1) ^a	127/128 (99,2) ^a
1,0 (16)	110/146 (75,3) ^b	132/137 (96,3) ^a
1,0 (14)	128/151 (84,7) ^a	137/150 (91,3) ^b
2,5	115/150 (76,6) ^b	129/138 (93,4) ^b
5,0	98/128 (76,5) ^b	110/118 (93,2) ^b

Três Réplicas.^{a,b} Diferentes subscritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). C/ CP: total de ovócitos em MII avaliado pela presença de CP; CP + Fixação: total de ovócitos em MII pela presença de CP e fixação dos ovócitos sem CP.

Ao incluir os dados da fixação, este tratamento apresentou novamente um resultado inferior ao não tratado. Curiosamente, o tratamento de 1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ por 16 horas, por sua vez, apresentou resultados inversos, inicialmente inferior e posteriormente semelhante ao controle, respectivamente (Tabela 3).

A citogenética dos ovócitos em MII foi realizada para avaliar o efeito do tratamento com Actinomicina D na conformação dos cromossomos do ovócito com CP (Figura 2).

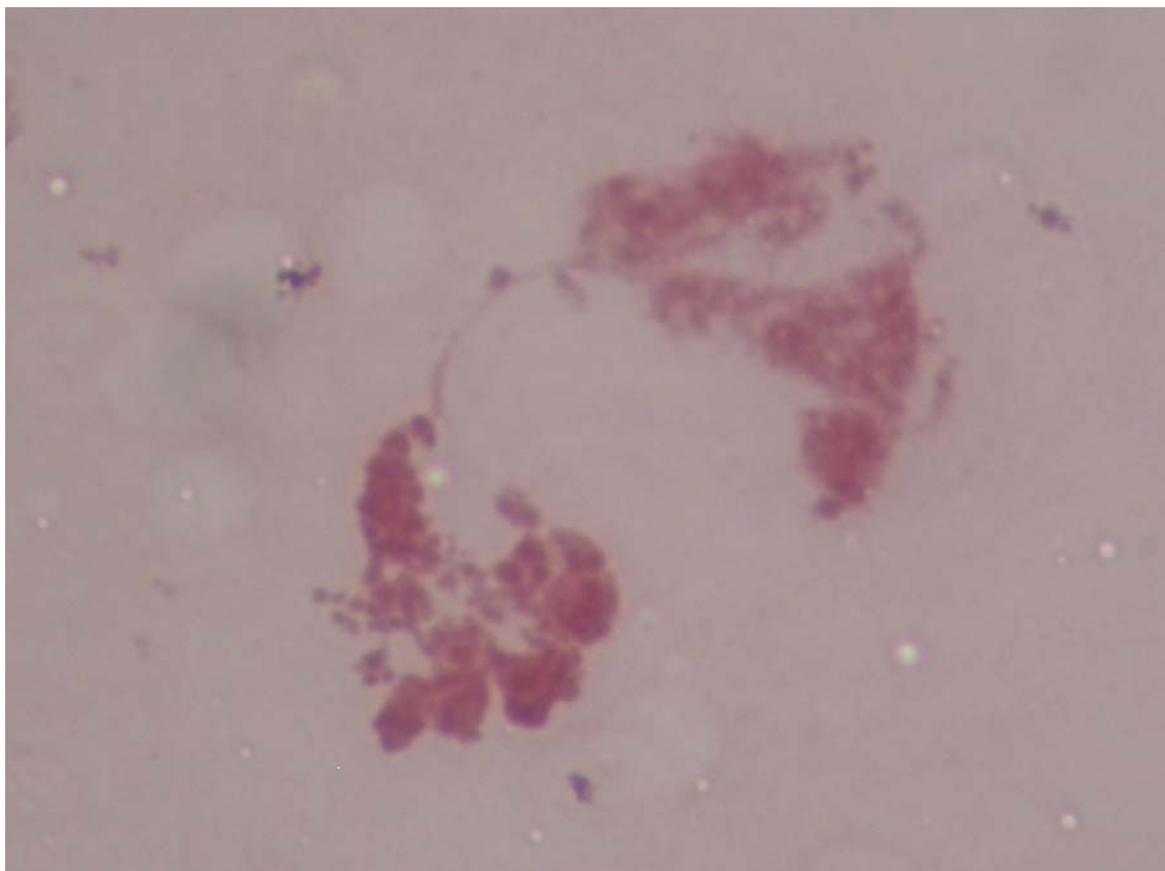
Figura 2. Morfologia dos cromossomos de ovócito em MII não tratado.



Apenas células que apresentavam CP foram utilizadas. Os ovócitos dos tratamentos controle e ambos os tratamentos com $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ não apresentaram alterações visíveis (Figura 2). No entanto, os tratamentos com $2,5$ e $5,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ apresentaram uma nítida agressão à morfologia dos cromossomos, dificultando a observação e delimitação individual dos mesmos (Figura 3).

Muitas vezes, os cromossomos se apresentavam como uma massa amorfa, detectada apenas pela sua coloração e ou presença do CP adjacente.

Figura 3. Morfologia dos cromossomos de ovócito tratado com actinomicina D com 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ por 14 horas.



Os ovócitos restantes dos tratamentos dos experimentos 1 foram ativados e utilizados com controle dos tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4. Desenvolvimento embrionário partenogênético controle do experimento 1.

Tratamento ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	n	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	
			D7	D8
0,0	66	51 (77,2) ^a	24 (36,3) ^a	31 (37,6) ^a
1,0 (16h)	66	35 (53,0) ^b	1 (1,5) ^b	4 (6,0) ^b
1,0 (14h)	108	69 (63,8) ^{a,b}	4 (3,7) ^b	9 (8,3) ^b
2,5	95	54 (56,8) ^b	0 (0,0) ^b	0 (0,0) ^c
5,0	51	21 (41,1) ^c	0 (0,0) ^b	0 (0,0) ^c

Três Réplicas.

Em relação ao experimento 2, foi avaliada a possibilidade de obter embriões clones por TN a partir de ovócitos enucleados pelo tratamento com Actinomicina D (Tabela 5). Foi escolhida a concentração de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ por 14 horas pela menor concentração e tempo de exposição, embora produzisse resultados semelhantes aos demais tratamentos. A nova metodologia, reconstruindo os ovócitos imediatamente mostrou-se mais simples e rápida. A taxa de clivagem obtida a partir de ovócitos tratados foi inferior ao controle, independente de terem sido manipulados (Tabela 5). No entanto, a taxa de produção de embriões reconstruídos foi maior que os tratados não manipulados, embora novamente inferior ao controle não tratado.

Três embriões da primeira réplica foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas, não havendo gestação na data prevista para o 28º dia de gestação.

Tabela 5. Avaliação do desenvolvimento de embriões obtidos por TN após enucleação química com actinomicina D.

Grupo	n	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	
			D7	D8
P 0,0	84	59 (70,2) ^a	32 (38,0) ^a	32 (38,0) ^a
P 1,0	220	135 (61,3) ^b	8 (3,6) ^c	8 (3,6) ^c
TN 1,0	101	62 (61,3) ^b	12 (11,8) ^b	12 (11,8) ^b

Três Réplicas. ^{a,b,c} Diferentes subscritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). P 0,0 = Partenogénéticos não tratados; P 1,0 = Partenogénéticos a partir de ovócitos tratados com 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de actinomicina D por 14 horas; TN 1,0 = Embriões reconstruídos a partir de ovócitos tratados com 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de actinomicina D por 14 horas.

Com o objetivo de avaliar a qualidade das estruturas, embriões foram fixados para analisar o percentual de células apoptóticas em embriões D3, após 64 horas de ativação (Tabela 6). A diferença de percentual foi bastante significativa entre os

embriões partenogénéticos não tratados e tratados ($P= 0,0016$). Ao compararmos os embriões reconstruídos, porém, não houve diferença ($P= 0,814$).

Tabela 6. Índice apoptótico de embriões partenogénéticos e reconstruídos por TN submetidos a diferentes tratamentos de Actinomicina D.

Grupo	Embriões (n)	Número médio de Blastômeros	Células Apoptóticas (%)
P 0,0	36	6,91 ^a	4,80 ^a
P 1,0	30	5,96 ^a	24,20 ^b
TN 0,0	16	6,37 ^a	13,00 ^y
TN 1,0	20	6,15 ^a	9,37 ^y

Três Réplicas. ^{a,b,y} Diferentes subscritos na coluna diferem significativamente ($p<0,05$). P 0,0: Embriões partenogénéticos a partir de ovócitos não tratados; P 1,0: Partenogénéticos a partir de ovócitos tratados com $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de actinomicina D por 14 horas; TN 0,0: Embriões reconstruídos a partir de ovócitos não tratados; TN 1,0: Embriões reconstruídos a partir de ovócitos tratados com $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de actinomicina D por 14 horas.

DISCUSSÃO

A clonagem por TN é uma técnica laboriosa que necessita um longo período para ser dominada. A produção dos embriões por TN requer uma seqüência de manipulações dos ovócitos, que permitem remover o DNA materno e introduzir um núcleo de uma célula de interesse. Estas etapas causam injúrias às células e limitam a produção destas estruturas, além de reduzir seu potencial de desenvolvimento. A eficiência de produção dos embriões está altamente relacionada ao sucesso desta extensiva manipulação e qualquer redução da mesma pode potencialmente aumentar a eficiência da técnica.

O ovócito é uma célula altamente diferenciada, incapaz de realizar divisões celulares simétricas, e que apresenta uma oferta limitada. Por isso, o método ideal de enucleação deve ser altamente eficiente, com um índice de sucesso alto. Além disso, deve preservar o potencial de desenvolvimento da célula, apresentando efeito residual mínimo do método. Diversos métodos alternativos foram relatados na literatura (Li et al., 2004b). Todos eles tinham como objetivo reduzir a agressão aos ovócitos e produzir populações maiores de citoplasmas para reconstrução. No entanto, estes métodos falharam em pelo menos um destes aspectos.

Essa necessidade motivou testar a actinomicina D como agente para enucleação. Baseando-se em relatos anteriores em células somáticas (Hikawa e Takenaka, 1996; Bayona-Bafaluy et al., 2003), foi avaliado o efeito de diferentes tratamentos de actinomicina D por 14 ou 16 horas durante a MIV de ovócitos e a capacidade dos mesmos de progredir até a formação de blastocistos.

Os ovócitos tratados foram significativamente menos eficientes em atingir a MII medida pela taxa de estruturas com CP, apesar de serem células temporariamente sem transcrição (Kocabas et al., 2006; Andreu-Vieyra et al., 2006).

Vários relatos indicam que as células do cumulus são importantes na MIV. As células do *cumulus* quando removidas antes das 4 primeiras horas de MIV reduzem significativamente a taxa de maturação (Li et al., 2006a). A presença de um inibidor de transcrição é capaz de afetar a eficiência da maturação nuclear apenas nas três

primeiras horas de MIV em bovinos (Tatemoto e Terada, 1995; Kastrop et al., 1991), reduzindo a síntese e fosforilação de proteínas (Kastrop et al., 1991). Estes resultados sugerem que a transcrição das células do *cumulus* durante as primeiras horas de MIV é fundamental para que o ovócito realize a maturação nuclear. Seguindo este princípio, o início do tratamento com actinomicina D no presente trabalho só ocorreu após quatro ou seis horas do início da MIV. Em decorrência desta afirmação, é plausível dizer que a transcrição inicial necessária não foi afetada pelos tratamentos utilizados.

Não é possível descartar a hipótese de que, em resposta a inibição da transcrição, as células do cumulus produzam algum fator que seja tóxico ao ovócito, afetando a maturação nuclear após a incubação com o inibidor (Mattioli et al., 1991). Seria importante investigar se esta é a via de ação da toxicidade observada no presente experimento. Curiosamente, a porcentagem de ovócitos de camundongo desnudos com CP não foi afetada após serem submetidos à concentração de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Actinomicina D por até 24 horas (Grondahl et al., 2000). O efeito do bloqueio da transcrição pelo α -amantin na maturação é dependente da presença das células do *cumulus* (Mattioli et al., 1991; Tatemoto e Terada, 1995). Este efeito também não parece ser dependente do método de bloqueio, pois diferentes moléculas inibitórias (α -amantin e 5,6-dicloro-1- β -D-ribofuranosibenzimidazole) resultam em dados semelhantes em zigotos (Chandolia et al., 1999).

A utilização da presença do CP é um método eficiente para detectar ovócitos maduros, que atingiram a fase de MII. No entanto, a ausência de um CP não é um indicador seguro de que o ovócito não tenha completado sua maturação nuclear. O primeiro CP é uma estrutura que permanece viável por pouco tempo, dependendo da espécie (Wakayama e Yanagimachi, 1998). Por isso, os ovócitos do presente trabalho, que não apresentavam CP após 24 horas de MIV foram fixados e 63% deles se encontravam em MII. Incluindo os dados da fixação, as taxas de maturação dos ovócitos tratados permaneceram inferiores ao controle.

A actinomicina D é conhecidamente uma molécula que se intercala no DNA (Sobell, 1985), o que resulta indiretamente em quebras e alterações da morfologia do mesmo (Jagiello, 1969; Lane, 1969). Ovócitos tratados apresentaram alterações

morfológicas após o tratamento *in vivo* e *in vitro* (Jagiello, 1969). Com o objetivo de avaliar este tipo de alteração em ovócitos tratados durante a MIV, gametas com CP após 24 horas de MIV foram submetidos à citogenética clássica.

O tratamento afetou severamente a morfologia dos cromossomos dos ovócitos que foram submetidos às concentrações 2,5 e 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ por 14 horas. Foi observada uma descondensação intensa dos cromossomos, seguida de quebras no DNA. Os demais grupos não apresentaram mudanças significativas. As alterações observadas foram mais severas que as relatadas anteriormente para ovócitos de camundongo (Jagiello, 1969), podendo ser devido às diferenças de concentrações utilizadas. No entanto, estas alterações não sugerem alterações citoplasmáticas, pois células tratadas com α -amantin, um inibidor reversível, apresentam alterações também reversíveis, porém significativas no nucléolo (Goldberg et al., 1962).

O uso da actinomicina D em ovócitos durante determinado período da MIV reduziu significativamente a taxa de clivagem no presente experimento, resultado semelhante foi relatado anteriormente em zigotos (Chandolia et al., 1999). É conhecido que há transcrição de alguns genes antes da ativação genômica, que ocorre na fase de transição de oito para dezesseis células (Memili et al., 1998). Este resultado sugere que estes genes são importantes para o desenvolvimento embrionário.

Os tratamentos foram eficientes ao reduzir significativamente a formação de blastocistos. Ao utilizar as concentrações de 1,0 e 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, apenas alguns embriões foram capazes de chegar a fase de blastocisto. Este fato indica que estes tratamentos foram capazes de abolir totalmente a síntese de RNA e DNA na maioria dos embriões. Apenas o tratamento com 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ foi capaz de inibir totalmente o desenvolvimento. Este resultado é interessante, pois representa uma concentração maior do que as concentrações normalmente utilizadas, entre 0,01 e 2,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Fabian et al., 2003), e por um período relativamente longo, de 14 horas. Por isso, ao utilizar este método, é importante utilizar diferentes controles do tratamento para monitorar os resultados obtidos.

O experimento dois teve como objetivo avaliar a capacidade dos ovócitos tratados de resistir às injúrias causadas pela TN e se desenvolverem até blastocistos. Foram realizadas quatro réplicas e foi possível demonstrar que o método é capaz de manter a viabilidade de pelo menos parte dos citoplasmas, como demonstrado pelo desenvolvimento obtido após a TN. Apesar de serem dados descritivos, eles são suficientemente convincentes para encorajar uma comparação direta com o método tradicional de enucleação.

Outro aspecto bastante descrito na literatura é a capacidade da Actinomicina D de induzir apoptose (Riley et al., 2004; Fabian et al., 2003; Li et al., 2006b). A incubação de células de carcinoma cervical na presença de Actinomicina D induz a expressão de p53 (Hietanen et al., 2000), o que explica de certa forma sua via de ação como agente anti-tumoral. Sua adição em embriões resulta em sinais semelhantes à apoptose (Fabian et al., 2003), mas não foi avaliado se esta resposta é dependente do estado proliferativo das células.

Devido a este poder clastogênico da actinomicina D em células em proliferação *in vitro*, foi realizado um experimento para analisar se o tratamento de ovócitos induziria apoptose em blastômeros de embriões reconstruídos por TN a partir deste tipo de ovócito. Foram utilizados embriões com 64 horas de cultivo pós-ativação e com seis blastômeros em média, que apresentam uma presença muito baixa de células apoptóticas (Gjorret et al., 2003, 2005). Ao comparar embriões partenogénéticos tratados com o controle, no presente experimento, observou-se uma diferença bastante significativa, onde os tratados apresentavam alta taxa de apoptose. Este dado condiz com os relatos anteriores, onde o tratamento produz células TUNEL positivas. No entanto, ao comparar embriões reconstruídos, não houve diferença. Estes dados sugerem que o citoplasma não foi afetado pelo tratamento, pois não há indução de apoptose em embriões reconstruídos. Este é um forte indício de que não há diferença qualitativa dos ovócitos enucleados produzidos.

Três embriões foram transferidos para receptoras sincronizadas, mas não houve gestação. No entanto, o número de estruturas impede qualquer avaliação da capacidade de desenvolvimento *in vivo* deste tipo de embrião. Porém, é importante avaliar esta característica em detalhe, pois métodos alternativos podem ser

eficientes na produção *in vitro* de embriões e ineficientes na obtenção de nascimentos (Zhou et al., 2000).

Um aspecto potencialmente negativo da enucleação com actinomicina D é a presença de DNA materno inativo fragmentado que pode ser integrado no genoma doador introduzido. Relatos conflitantes foram descritos, onde a actinomicina D seria um fator inibidor (Seto e Tomasz, 1977) ou um estimulador da recombinação genética (Nestmann et al., 1981). Uma resposta plausível seria a diferença de resposta entre organismos, sendo necessário avaliar futuramente este tipo de fenômeno em embriões clonados a partir deste tratamento.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados descritos acima, o tratamento de ovócitos bovinos com actinomicina D durante a MIV é capaz de inibir o posterior desenvolvimento embrionário. O mecanismo de inibição parece ser através do bloqueio da transcrição e/ou replicação, sugerido pelas alterações observadas nos cromossomos dos ovócitos. Mais importante, esta inibição é revertida através da introdução de um núcleo exógeno, demonstrada pela formação de blastocistos a partir dos ovócitos reconstruídos. Estes embriões apresentam número médio de blastômeros e índice apoptótico semelhante aos controles, indicadores estes de qualidade de embriões.

Estes resultados em conjunto suportam a hipótese de que a actinomicina D é um método alternativo de enucleação química de ovócitos maturados *in vitro* destinados à TN.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados demonstraram que o uso de um inibidor irreversível de transcrição e replicação, a actinomicina D, torna o ovócito dependente de um núcleo exógeno para desenvolver até a formação de um blastocisto. Porém, diversos questionamentos permanecem sem investigação. É possível que a inibição das células do *cumulus* afete a maturação nuclear do ovócito. Para testar esta hipótese, será necessário desnudar parte dos ovócitos imediatamente antes do início do tratamento e aferir a taxa de maturação ao final da MIV. Além disso, os resultados referentes às taxas de maturação endossam a importância de utilizar outras metodologias para aferir a qualidade do citoplasma dos ovócitos tratados. Com este objetivo, parte dos ovócitos do presente experimento foi fixada para posterior análise através da microscopia eletrônica de transmissão.

A demonstração da inibição do desenvolvimento pela detecção de replicação nos ovócitos após a ativação partenogenética seria uma forma mais objetiva de avaliação da enucleação. Ainda mais importante é analisar se os embriões reconstruídos ainda apresentam DNA oriundo do ovócito. Como teste final do conteúdo genético dos embriões, será necessário demonstrar que é possível obter nascimentos após a transferência deste tipo de embrião a receptoras sincronizadas.

Finalmente, será fundamental comparar contemporaneamente a enucleação por actinomicina D com a metodologia tradicional para determinar se a nova abordagem é mais eficiente em produzir citoplasmas receptores para TN.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREU-VIEYRA, C.; LIN, Y. N.; MATZUK, M. M. Mining the oocyte transcriptome. **Trends Endocrinol Metab**, v. 17, n. 4, p. 136-143, 2006.

BAYONA-BAFALUY, M. P.; MANFREDI, G.; MORAES, C. T. A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to rho(o) cells. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 16, p. e98, 2003.

BOUSQUET, D.; BLONDIN, P. Potential uses of cloning in breeding schemes: dairy cattle. **Cloning Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 190-197, 2004.

BROPHY, B.; SMOLENSKI, G.; WHEELER, T., et al. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 2, p. 157-162, 2003.

CHANDOLIA, R. K.; PELTIER, M. R.; TIAN, W., et al. Transcriptional control of development, protein synthesis, and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell bovine embryos. **Biol Reprod**, v. 61, n. 6, p. 1644-1648, 1999.

EGGAN, K.; BALDWIN, K.; TACKETT, M., et al. Mice cloned from olfactory sensory neurons. **Nature**, v. 428, n. 6978, p. 44-49, 2004.

FABIAN, D.; REHAK, P.; CZIKKOVA, S., et al. Induced cell death of preimplantation mouse embryos cultured in vitro evaluated by comet assay. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 691-706, 2003.

GJORRET, J. O.; KNIJN, H. M.; DIELEMAN, S. J., et al. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. **Biol Reprod**, v. 69, n. 4, p. 1193-1200, 2003.

GJORRET, J. O.; WENGLE, J.; MADDOX-HYTTEL, P., et al. Chronological appearance of apoptosis in bovine embryos reconstructed by somatic cell nuclear

transfer from quiescent granulosa cells. **Reprod Domest Anim**, v. 40, n. 3, p. 210-216, 2005.

GOLDBERG, I. H.; RABINOWITZ, M.; REICH, E. Basis of actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 48, p. 2094-2101, 1962.

GRONDAHL, C.; LESSL, M.; FAERGE, I., et al. Meiosis-activating sterol-mediated resumption of meiosis in mouse oocytes in vitro is influenced by protein synthesis inhibition and cholera toxin. **Biol Reprod**, v. 62, n. 3, p. 775-780, 2000.

HIETANEN, S.; LAIN, S.; KRAUSZ, E., et al. Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 15, p. 8501-8506, 2000.

HIKAWA, N.; TAKENAKA, T. Improved method for producing neuronal hybrids using emetine and actinomycin D. **Brain Res**, v. 734, n. 1-2, p. 345-348, 1996.

HOCHEDLINGER, K.; BLELLOCH, R.; BRENNAN, C., et al. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. **Genes Dev**, v. 18, n. 15, p. 1875-1885, 2004.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1061-1067, 2006.

HOLT, W. V.; PICKARD, A. R.; PRATHER, R. S. Wildlife conservation and reproductive cloning. **Reproduction**, v. 127, n. 3, p. 317-324, 2004.

JAGIELLO, G. M. Meiosis and inhibition of ovulation in mouse eggs treated with actinomycin D. **J Cell Biol**, v. 42, n. 2, p. 571-574, 1969.

KASTROP, P. M.; HULSHOF, S. C.; BEVERS, M. M., et al. The effects of alpha-amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and

phosphorylation during bovine oocyte maturation in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 28, n. 3, p. 249-254, 1991.

KOCABAS, A. M.; CROSBY, J.; ROSS, P. J., et al. The transcriptome of human oocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 38, p. 14027-14032, 2006.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends Biotechnol**, v. 22, n. 6, p. 286-294, 2004.

KUROIWA, Y.; KASINATHAN, P.; CHOI, Y. J., et al. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. **Nat Biotechnol**, v. 20, n. 9, p. 889-894, 2002.

KUROIWA, Y.; KASINATHAN, P.; MATSUSHITA, H., et al. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. **Nat Genet**, v. 36, n. 7, p. 775-780, 2004.

LANE, N. J. Intranuclear fibrillar bodies in actinomycin D-treated oocytes. **J Cell Biol**, v. 40, n. 1, p. 286-291, 1969.

LI, J.; ISHII, T.; FEINSTEIN, P., et al. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. **Nature**, v. 428, n. 6981, p. 393-399, 2004a.

LI, G. P.; WHITE, K. L.; BUNCH, T. D. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. **Cloning Stem Cells**, v. 6, n. 1, p. 5-13, 2004b.

LI, G. P.; BUNCH, T. D.; WHITE, K. L., et al. Denuding and centrifugation of maturing bovine oocytes alters oocyte spindle integrity and the ability of cytoplasm to support parthenogenetic and nuclear transfer embryo development. **Mol Reprod Dev**, v. 73, n. 4, p. 446-451, 2006a.

LI, W.; CAI, S.; CAI, L., et al. Anti-apoptotic effect of hepatocyte growth factor from actinomycin D in hepatocyte-derived HL7702 cells is associated with activation of PI3K/Akt signaling. **Toxicol Lett**, v. 165, n. 2, p. 142-148, 2006b.

LOI, P.; PTAK, G.; BARBONI, B., et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. **Nat Biotechnol**, v. 19, n. 10, p. 962-964, 2001.

MATTIOLI, M.; GALEATI, G.; BACCI, M. L., et al. Changes in maturation-promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. **Mol Reprod Dev**, v. 30, n. 2, p. 119-125, 1991.

MELO, E. O.; SOUSA, R. V.; IGUMA, L. T., et al. Isolation of transfected fibroblast clones for use in nuclear transfer and transgene detection in cattle embryos. **Genet Mol Res**, v. 4, n. 4, p. 812-821, 2005.

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

MOURA, M. T.; MELO, A. H.; TEIXEIRA, Á. A. C.; et al., Uso de Diferentes métodos de coloração para a identificação de células epiteliais no sêmen bovino. **III Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 2003, Recife PE, 2003.

MOURA, M. T.; MUNDIM, T. C. D.; SOUSA, R. V., et al. Expressão diferencial dos genes imprinted IGF2R e GRB10 em embriões clones bovinos produzidos por transferência nuclear. **Anais do 52º Congresso Brasileiro de Genética**. p. 269, 2006a.

MOURA, M. T.; MUNDIM, T. C. D.; DODE, M. A., et al. Análise da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo em embriões clones e partenogênicos bovinos. **Anais do 52º Congresso Brasileiro de Genética**. p. 270, 2006b.

NESTMANN, E. R.; NASIM, A.; HAYNES, R. H., et al. Genetic activity of actinomycin D in *Saccharomyces cerevisiae* but not in *Escherichia coli*. **Mutat Res**, v. 89, n. 3, p. 229-236, 1981.

OSADA, T.; YAGI, T. Neuronal genomics using mouse cloning with the single neuronal nucleus. **Current Genomics**, v. 7, p. 217-225, 2006.

PHELPS, C. J.; KOIKE, C.; VAUGHT, T. D., et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. **Science**, v. 299, n. 5605, p. 411-414, 2003.

RILEY, J. K.; HEELEY, J. M.; WYMAN, A. H., et al. TRAIL and KILLER are expressed and induce apoptosis in the murine preimplantation embryo. **Biol Reprod**, v. 71, n. 3, p. 871-877, 2004.

SCHNIEKE, A. E.; KIND, A. J.; RITCHIE, W. A., et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v. 278, n. 5346, p. 2130-2133, 1997.

SETO, H.; TOMASZ, A. Inhibitors of genetic recombination in pneumococci. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 1, p. 296-299, 1977.

SOBELL, H. M. Actinomycin and DNA transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 16, p. 5328-5331, 1985.

TATEMOTO, H.; TERADA, T. Time-dependent effects of cycloheximide and alpha-amanitin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v. 43, n. 6, p. 1107-1113, 1995.

TRASK, D. K.; MULLER, M. T. Stabilization of type I topoisomerase-DNA covalent complexes by actinomycin D. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 5, p. 1417-1421, 1988.

WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. The first polar body can be used for the production of normal offspring in mice. **Biol Reprod**, v. 59, n. 1, p. 100-104, 1998.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R., et al. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. **Reprod Fertil Dev**, v. 10, n. 4, p. 369-378, 1998.

WESTHUSIN, M. E.; LONG, C. R.; SHIN, T., et al. Cloning to reproduce desired genotypes. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 35-49, 2001.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J., et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-813, 1997.

ZHOU, Q.; BOULANGER, L.; RENARD, J. P. A simplified method for the reconstruction of fully competent mouse zygotes from adult somatic donor nuclei. **Cloning**, v. 2, n. 1, p. 35-44, 2000.