



ATIVÇÃO PARTENOGENÉTICA DE OÓCITOS BOVINOS

Bárbara Fachini Agostinho¹; Isabele Picada Emanuelli²; Luiz Paulo Rigolon³; Fábio José Lourenço³; Milena Seko⁴

RESUMO: A clonagem animal se traduz no grande avanço tecnológico obtido no campo da biotecnologia animal. A técnica de transferência nuclear envolve duas etapas: a enucleação de oócitos em metáfase II e a transferência do núcleo da célula doadora. Em seguida, iniciasse a etapa de fusão elétrica e ativação partenogenética do oócito enucleado gerando um novo indivíduo geneticamente idêntico à célula somática doadora. A ativação partenogenética é uma das etapas críticas para o sucesso da técnica de transferência nuclear. Desta forma, o objetivo deste estudo foi testar o micro-sistema de cultura embrionária individual (WOW) em dois grupos de oócitos bovinos ativados partenogeneticamente: oócitos com zona pelúcida e oócitos livres de zona pelúcida. O experimento foi desenvolvido no Centro de Biotecnologia da Reprodução (BIOTEC). Os oócitos obtidos foram maturados *in vitro* e divididos em 3 grupos: GCZ (oócitos com zona pelúcida), GSZ (oócitos sem zona pelúcida), GFIV (FIV convencional). Em 48 horas (dia 2 pós-ativação) foi avaliada a taxa de clivagem, dia sete a taxa de blastocisto e as taxas de blastocistos expandidos. Desta forma, os oócitos GCZ e GSZ apresentaram respectivamente, 66,3% e 58,1% de taxa de clivagem, 26,9% e 29,1% de taxa de blastocisto e 64,3% e 47,1% de taxa de blastocisto expandido. Concluímos que o sistema de cultivo embrionário (WOW) é eficaz no desenvolvimento embrionário partenogenético na ausência de zona pelúcida até o estágio de blastocisto, no entanto ao retirar os embriões dos poços o sistema diminui as taxas de expansão dos blastocistos.

PALAVRAS-CHAVE: Transferência nuclear; Ativação partenogenética; Oócitos; Blastocisto.

1 INTRODUÇÃO

Nos animais domésticos o desenvolvimento de novas técnicas para a produção de embriões *in vitro*, transferência nuclear e criopreservação, tem revolucionado os programas de reprodução por acelerar a eficiência reprodutiva de muitas espécies (OZIL, 1998).

A clonagem animal se traduz sem dúvida no grande avanço tecnológico obtido no campo da biotecnologia animal. Esta se justifica pela multiplicação de animais geneticamente superiores impossibilitados de reproduzir-se ou que morreram e desta forma, existe a necessidade de preservação do material genético do mesmo.

Em todas as espécies de mamíferos em que a clonagem obteve sucesso apenas uma baixa parcela dos embriões obtidos por transferência nuclear desenvolveu-se até o nascimento, e desses, muitos morreram brevemente após o nascimento, estas falhas tem impulsionado as pesquisas na área.

A técnica de transferência nuclear (NT) envolve duas etapas: a enucleação de oócitos em metáfase II e a transferência do núcleo da célula doadora. Após iniciasse a etapa de fusão elétrica e ativação partenogenética do oócito enucleado gerando um novo

¹ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). baby@wnet.com.br

² Orientadora e docente do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. isabele@cesumar.br

³ Co-orientadores e docentes do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. rigolon@cesumar.br

⁴ Técnica. Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (BIOTEC) / Fazenda CESUMAR. biotec@cesumar.br

indivíduo geneticamente idêntico à célula somática doadora. A ativação partenogenética é uma das etapas críticas para o sucesso da técnica de transferência nuclear.

Oócitos bovinos ovulados ou maturados *in vitro* estão presos no estágio de metáfase II (MII) e só completam a meiose depois da ativação por espermatozóide ou por estímulo artificial (MÉO, et al., 2007). Na partenogênese os cromossomos contidos na placa metafásica II sofrem descondensação se organizando com um núcleo com 2C DNA que pode sofrer clivagem.

Em todas as espécies mamíferas a ativação do oócito desencadeia aumentos repetitivos na concentração de Ca^{2+} intracelular (MIYAZAKI, et al., 1993).

No presente estudo, foram empregados para a ativação de oócitos jovens o cálcio ionóforo associado ao 6-DMAP. O cálcio ionóforo utilizado sozinho requer a associação a outro agente para a ativação de oócitos jovens, desta forma, se associa o 6-DMAP que promove a inativação e previne o restabelecimento do MPF (PORCIUNCULA, 2007).

Na clonagem, a metodologia para enucleação dos oócitos pode ser realizada por duas técnicas: micromanipulação ou manualmente pelo método de remoção nuclear manual (*Handmad Cloning* – HMC). Visto que a metodologia de clonagem por micromanipulação possui sucesso limitado na qualidade e desenvolvimento embrionário e possui um custo elevado, a técnica utilizada em nosso laboratório foi a HMC.

Para realização da clonagem HMC, torna-se necessário a remoção da zona pelúcida para o corte do oócito e sua perfeita enucleação. Este processo implica num desenvolvimento embrionário *in vitro* sem a presença da zona pelúcida. Neste caso, se faz necessário um micro-ambiente para a cultura dos embriões mimetizando uma zona pelúcida e assim delimitando o espaço de crescimento dos blastômeros do embrião até o estágio de blastocisto expandido.

Este sistema de cultivo embrionário individual em micropoços foi descrito pela primeira vez por Vajta (2000) e é conhecido como *Well of the Well* (WOW).

Tendo em vista a importância do processo de ativação partenogenética na metodologia da clonagem, a necessidade da utilização de um micro-sistema de cultura embrionária individual livre de zona pelúcida (WOW) e o fato da clonagem ainda ser uma técnica bastante limitada, o objetivo deste trabalho foi testar o micro-sistema de cultura embrionária individual (WOW) em dois grupos de oócitos bovinos ativados partenogeneticamente: oócitos com zona pelúcida e oócitos livres de zona pelúcida.

2 MATERIAIS E METÓDOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Fertilização *in vitro* no Centro de Biotecnologia da Reprodução (BIOTEC). Os complexos de *cumulus oophorus* (COCs) foram obtidos de ovários de vacas oriundos de abatedouros localizados na cidade de Maringá-Pr.

Os oócitos selecionados foram de grau 1, após foram maturados em meio TCM199 com sais de Earles, glutamina e $NaHCO_3$ suplementado com 10% de SFB, piruvato (22 μ g/ml), gentamicina (50 μ g/ml) e 0,5 μ g de FSH/ml, 50 μ g de LH/ml em gotas de 90 μ l de meio de maturação, cobertas com óleo mineral e levados à incubadora a 39°C, 5% CO_2 em ar e com máxima umidade, durante 21-22 horas.

Após a maturação os oócitos foram divididos em 3 grupos: GCZ (oócitos com zona pelúcida), GSZ (oócitos sem zona pelúcida), GFIV (FIV convencional). Os oócitos GCZ e GSZ foram desnudados mecanicamente em 500 μ l de Hialuronidase (1 mg/ml) por 3 minutos. No GSZ foi feita a digestão da zona pelúcida com Pronase (10mg/ml) em TCM Hepes com 10% de Soro Fetal Bovino (T10) e no GCZ a zona pelúcida permaneceu intacta.

A ativação partenogenética de ambos os grupos (GSZ e GCZ) foi iniciada pela exposição de 5 minutos em Cálcio Ionóforo diluído em 400µL de TCM Hepes 199 com 2% de soro fetal bovino (T2), seguido de mais três lavagens em 400µL de TCM Hepes 199 com 20% de Soro fetal Bovino (T20), sendo que as quatro lavagens dos oócitos foram feitas em Shaker a 38°C, por 5 minutos cada lavagem. O restante do processo de ativação foi realizado por um período de 5-6 horas de incubação em estufa a 38°C, 5% de CO₂ e umidade máxima onde os COCs foram primeiramente lavados e distribuídos um a um em microgotas de 2µl de Meio de Cultivo SOF Nutricell® acrescido de 6-DMAP 16,3 mg/ml em TCM Hepes.

Finalmente após este período os grupos foram cultivados em meio SOF em placas de Nunc em que o GCZ permaneceu em uma gota de cultivo e o GSZ no sistema Well of the Well (micropoços individuais).

Os oócitos do GFIV foram submetidos ao processo de FIV convencional. O cultivo foi realizado por 18 horas pós-inseminação, em incubadora, com atmosfera gasosa contendo 20% CO₂ em ar, com máxima umidade.

Todos os oócitos dos 3 grupos permaneceram em estufa nas condições já descritas até o nono dia após a ativação. Em 48 horas (dia 2 pós-ativação) foi avaliada a taxa de clivagem, dia sete a taxa de blastocisto e a taxa blastocistos expandidos.

Foi realizada uma análise descritiva para todos os tratamentos e para os tratamentos de forma geral e calculadas medidas descritivas associadas a todas as variáveis envolvidas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 demonstra o GCZ (oócitos com zona pelúcida), cuja o total de oócitos ativados foram 104 e destes 69 (66,3%) clivaram, 28 (26,9%) chegaram ao estágio de blastocisto e 18 (64,3%) a blastocisto expandido.

Tabela 1: Taxas de clivagem, blastocisto e blastocisto expandido das repetições realizadas no oócitos ativados partenogeneticamente e cultivados na presença de zona pelúcida

	COCs						
	(n)	Cliv	Cliv %	BI	BI %	Bx	Bx % *
Rep 01	30	22	73,3	9	30,0	6	66,7
Rep 02	35	24	68,6	10	28,6	7	70,0
Rep 03	39	23	59,0	9	23,1	5	55,6
Total	104	69	66,3	28	26,9	18	64,3

* A taxa de expansão foi realizada sobre os blastocistos totais

A tabela 2 demonstra os oócitos GSZ (oócitos sem zona pelúcida) que foram incubados no Sistema *Well of the Well* (WOW), totalizando 117 oócitos ativados, em que destes 68 clivaram (58,1%), 34 chegaram ao estágio de blastocisto (29,1%) e 16 à blastocisto expandido (47,1%). Este foi o grupo que obteve as menores taxas e obteve principalmente uma grande diferença em relação à taxa de blastocistos expandidos, esse fato se deu, pois os embriões foram retirados do sistema WOW quando chegaram a blastocisto e nesse processo houve muitas perdas embrionários já que as células não suportaram e acabaram arrebatando e morrendo. Segundo Vajta, et al., 2001 esse ponto crítico se dá pelo fato de no momento da remoção dos blastocistos do sistema WOW algumas vezes existe dificuldade pelo fato de 30% das células trofoblásticas dos embriões estarem aderidos na parede da placa. Porém para o desenvolvimento até blastocisto o sistema WOW se mostra eficaz.

Tabela 2: Taxas de clivagem, blastocisto e blastocisto expandido das repetições realizadas em oócitos ativados partenogeneticamente e cultivados na ausência de zona pelúcida no sistema WOW.

	COCs						
	(n)	Cliv	Cliv %	BI	BI %	Bx	Bx % *
Rep 01	36	19	52,8	12	33,3	5	41,7
Rep 02	31	18	58,1	7	22,6	3	42,9
Rep 03	50	31	62,0	15	30,0	8	53,3
Total	117	68	58,1	34	29,1	16	47,1

* A taxa de expansão foi realizada sobre os blastocistos totais

A tabela 3 corresponde ao GFIV (FIV convencional) que totalizou 95 oócitos cuja a taxa de clivagem foi de 84,2%, a de blastocisto 38,9% e a de blastocisto expandido 83,8%.

Tabela 3: Taxas de clivagem, blastocisto e blastocisto expandido das repetições realizadas no grupo controle FIV (10 COC/gotas de 70µl)

	COCs						
	(n)	Cliv	Cliv %	BI	BI %	Bx	Bx % *
Rep 01	33	30	90,9	16	48,5	14	87,5
Rep 02	42	35	83,3	14	33,3	10	71,4
Rep 03	20	15	75,0	7	35,0	7	100,0
Total	95	80	84,2	37	38,9	31	83,8

* A taxa de expansão foi realizada sobre os blastocistos totais

A tabela 4 reúne todos os oócitos de cada grupo e suas respectivas taxas de clivagem, blastocisto e blastocisto expandido.

Tabela 4: Taxas de clivagem, desenvolvimento até blastocisto no dia 7 e taxa de blastocisto expandido do GCZ (oócitos com zona pelúcida), GSZ (oócitos sem zona pelúcida) e GFIV (controle FIV).

	COCs (n)	Cliv	Cliv %	BI	BI %	Bx	Bx % *
GCZ	104	69	66,3	28	26,9	18	64,3
GSZ	117	68	58,1	34	29,1	16	47,1
GFIV	95	80	84,2	37	38,9	31	83,8

* A taxa de expansão foi realizada sobre os blastocistos totais

Portanto, não houve diferença estatística entre os grupos, porém há uma tendência estatística de diferença numérica. Provavelmente, isto se deu devido ao baixo número de repetições utilizadas, já que trata-se de um projeto piloto inserido em um projeto de clonagem que está sendo realizado em nosso laboratório.

Observa-se que as taxas do GSZ obtiveram os menores resultados de clivagem, blastocisto e blastocisto expandido e este fato pode ser explicado por estudos realizados anteriormente por Booth et al, 2001, em que se afirma que os oócitos sem zona pelúcida são mais frágeis comparados com os de zona intacta, principalmente pelo fato dos agentes utilizados na ativação partenogenética poderem causar efeitos severos na integridade da membrana plasmática dos oócitos. Este mesmo autor obteve após ativação de oócitos sem zona pelúcida utilizando Cálcio ionóforo associado ao 6-DMAP uma taxa de blastocisto de 50%, portanto, muito maior à obtida no presente estudo.

Em outro estudo realizado por Vajta et al, 2001, que também utilizou oócitos sem zona pelúcida e o mesmo tratamento de ativação do presente estudo, além do sistema

WOW de cultura. Obteve 74% de taxa de clivagem e 18% de blastocistos. Resultados que corroboram com o presente estudo.

Em um estudo que procurou comparar vários tratamentos de ativação (cálcio ionóforo, estrôncio e etanol) em oócitos com zona pelúcida, o cálcio ionóforo obteve 73,7% de clivagem e 24,7% de blastocistos. Os resultados deste estudo demonstraram que o melhor ativador em termos de taxas de clivagem e blastocistos foi o cálcio ionóforo associado ao 6-DMAP (HOSSEINI, et al, 2007). Fato este que justifica o uso deste protocolo no atual estudo.

O microambiente criado pelo sistema WOW permite que haja uma adequada concentração dos fatores embrionários além de promover a difusão de substâncias tóxicas originadas do metabolismo embrionário (TAKA, M; IWAYAMA, H; FUKUI, Y., 2005). Portanto, trata-se de um sistema eficaz para o cultivo de embriões ativados partenogeneticamente.

4 CONCLUSÃO

Podemos concluir que o sistema de cultivo embrionário WOW é eficaz no desenvolvimento embrionário partenogenético na ausência de zona pelúcida até o estágio de blastocisto, no entanto ao retirar os embriões dos poços o sistema diminui as taxas de expansão dos blastocistos.

REFERÊNCIAS

BOOTH, P.J., et al. Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona-free manipulation technique. **Cloning and stem cells**. v. 3, p 139-150, 2001.

HOSSEINI, S.M., et al. Optimized combined electrical-chemical parthenogenetic activation for in vitro matured bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**. 2007.

MÉO, S.C., et al. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using single and combined strontium, ionomycin and 6-dimethylaminopurine treatments. **Zygote**. v.15, p. 295-306, 2007.

MIYAZAKI, S., et al. Essential role of the inositol 1,4,5-Triphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. **Developmental Biology**. v. 158, p. 62-78, 1993.

OZIL, J-P. Role of calcium oscillations in mammalian egg activation: experimental approach. **Biophysical Chemistry**. v.72, p.141-152, 1998.

PORCIUNCULA, P.M. **Ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens com ionomicina e 6-dimetilaminopurina associado ou não ao estrôncio**. 2007. 80f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

TAKA, M; IWAYAMA, H; FUKUI, Y. Effect of Well of the Well (WOW) system on in vitro culture for porcine embryos after intracytoplasmic sperm injection. **Journal of Reproduction and Development**. v.51, p. 533-537, 2005.

VAJTA, G., et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. **Mol. Reprod. Dev.** 2000, 256-64, 2000.

VAJTA, G., et al. Somatic cell cloning without micromanipulators. **Cloning.** v.3, p.89-95, 2001.