

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Sabine Wohlres Viana

**EXPRESSÃO GÊNICA EM EMBRIÕES DE *Bos taurus* E *Bos indicus*
PRODUZIDOS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Juiz de Fora, 2009

SABINE WOHLRES VIANA

**EXPRESSÃO GÊNICA EM EMBRIÕES DE *Bos taurus* E *Bos indicus*
PRODUZIDOS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Machado

Co-Orientador: Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Juiz de Fora, 2009

Folha de Aprovação

Sabine Wohlfres Viana

Expressão Gênica em Embriões de *Bos taurus* e *Bos indicus* Produzidos *in vivo* e *in vitro*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Juiz de Fora para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Genética e Biotecnologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marco Antonio Machado

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora / Embrapa Gado de Leite

Assinatura: _____

Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Instituição: Embrapa Gado de Leite

Assinatura: _____

Dr. Lyderson Facio Viccini

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora

Assinatura: _____

Aos meus pais, Dieter e Clotilde, por sempre me apoiarem e por serem responsáveis pela pessoa que me tornei.

Aos meus irmãos, Frank e Karin, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo carinho e incentivo.

Ao meu amor, João, pelo apoio em todos os momentos, pelo incentivo e por me fazer acreditar sempre que isto era possível.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Gado de Leite, por ceder o local, animais e materiais necessários para a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Machado, pela orientação, conselhos, confiança e incentivo que foram fundamentais durante o período do mestrado.

Ao Pesquisador da Embrapa Gado de Leite e co-orientador, Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, pela oportunidade de realizar os experimentos e acima de tudo, pela confiança durante o desenvolvimento do estudo.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, Michele, Ribrio, Paulo, Carolina, Raquel, Juliana, Bruno e Elisa, pela ajuda e compreensão nos momentos de alegria e de tensão.

Aos funcionários do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, Myro e Joel, pela ajuda e apoio durante a realização dos experimentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, Robert, Carla e Ana Luisa, pela ajuda e bom humor sempre.

À Bruna Rios e ao Del (Gilmar), funcionários da Embrapa Gado de Leite, pela preocupação e ajuda nos momentos difíceis.

Aos amigos André Penido, Paula e Fernanda, pela preocupação e por todas as quartas-feiras.

Aos colegas de turma no mestrado, especialmente Fernanda e Carol, pelo carinho e amizade.

Aos amigos Adriana, Arashiro, Isabella e Graziela, que sempre acreditaram e torceram, me ajudando a ter persistência e confiança.

Aos familiares, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo incentivo.

A todos que, eventualmente eu possa ter esquecido de agradecer, mas que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Palavras-chave: blastocisto, mRNA, cultivo *in vitro*, bovinos, raça.

Embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* apresentam diferenças morfológicas e de desenvolvimento as quais podem ser influenciadas pelo de cultivo. Além disso, existem poucos estudos mostrando o efeito do ambiente *in vitro* sobre os embriões provenientes de diferentes raças bovinas como, por exemplo, Gir (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*). Alguns genes importantes para a formação, sobrevivência e posterior desenvolvimento de embriões bovinos podem ter seu padrão de expressão influenciado por diversos fatores relacionados ao sistema de produção e a raça. O objetivo deste estudo foi avaliar a abundância relativa de transcritos relacionados ao transporte de água e solutos (Aquaporinas), formação da blastocele (Na/K-ATPases), apoptose (BAX) e resposta a estresse celular (Peroxiredoxina 1) em blastocistos bovinos das raças Gir e Holandesa produzidos *in vivo* e *in vitro* para identificar efeitos de sistema de produção e/ou raça. Para cada grupo (Gir-*in vivo*; Gir-*in vitro*; Holandês-*in vivo*; Holandês-*in vitro*), blastocistos (n=15) divididos em três conjuntos foram utilizados para a extração do RNA, amplificação, e transcrição reversa. Os cDNAs obtidos foram submetidos à PCR em Tempo-Real, utilizando o gene H2a como controle endógeno, e analisados pelo software REST[®]. Na avaliação de efeito do sistema de produção para a raça Gir, a expressão relativa do gene PRDX1 apresentou-se sub-regulada ($p < 0,01$) assim como nos genes Na/K-ATPase- $\beta 2$ e BAX ($p < 0,05$), enquanto os genes AQP3, AQP11 e Na/K-ATPase- $\alpha 1$ não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nas amostras de embriões produzidos *in vitro* comparados com embriões *in vivo*. Na raça Holandesa, a expressão relativa do gene BAX apresentou-se sobre-regulada ($p < 0,01$), enquanto o gene Na/K-ATPase- $\beta 2$ apresentou uma tendência a sub-regulação ($p = 0,06$) e os genes AQP3, AQP11, Na/K-ATPase- $\alpha 1$, PRDX1 não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nas amostras de embriões produzidos *in vitro* comparados com embriões *in vivo*. Quando a produção *in vivo* foi avaliada entre as raças, os embriões da raça Holandesa apresentaram os genes AQP3, Na/K-ATPase- $\alpha 1$, PRDX1, e BAX sub-regulados ($p < 0,05$), enquanto os genes Na/K-ATPase- $\beta 2$ e AQP11 não demonstraram diferenças significativas na expressão ($p > 0,05$) quando comparados com embriões da raça Gir. Para a produção *in vitro*, apenas o gene BAX apresentou-se sobre-regulado ($p < 0,05$) nos embriões da raça Holandesa quando comparados com embriões da raça Gir. Com base nestes resultados pode-se concluir que, para os genes avaliados, existem diferenças na expressão gênica inerentes às raças observadas nos embriões produzidos *in vivo* e que o sistema de produção *in vitro* pode influenciar a expressão gênica, atenuando estas variações. A avaliação de outros transcritos é necessária para uma melhor compreensão dos efeitos relacionados aos processos de produção de embriões bovinos em diferentes raças.

ABSTRACT

Keywords: blastocyst, mRNA, in vitro culture, bovine, breed

Embryos produced in vivo and in vitro show morphological and developmental differences, which can be influenced by culture environment. Nevertheless, there are few studies showing the effect of in vitro environment on embryos from different bovine breeds, such as Gyr (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*). Some important genes associated to formation, survival and subsequent development of bovine embryos can be affected by various factors related to the production system and breed. The aim of this study was to evaluate the relative abundance of transcripts associated to water transport (Aquaporins), blastocoel formation (Na/K-ATPases), apoptosis (BAX) and response to cellular stress (Peroxisome oxidoreductin 1) in bovine blastocysts from Gyr and Holstein breed produced in vivo and in vitro to identify breed and/or production system effects. For each group (Gyr-*in vivo*; Gyr-*in vitro*; Holstein-*in vivo*; Holstein-*in vitro*), blastocysts (n=15) distributed in 3 pools were used for RNA extraction, followed by RNA amplification and reverse transcription. The cDNAs obtained were submitted to Real-Time PCR, using the H2a gene as endogenous control, and analyzed with *REST software*[®]. For the production system in the Gyr embryos, the relative expression of PRDX1 gene was down-regulated (p<0.01) as well as Na/K-ATPase- β 2 and BAX genes (p<0.05), and the AQP3, AQP11 and Na/K-ATPase- α 1 genes were not significantly different (p>0.05) when in vitro embryos were compared with in vivo produced ones. In Holstein embryos, BAX was up-regulated in in vitro embryos (p<0.01), while AQP3, AQP11, Na/K-ATPase- α 1, Na/K-ATPase- β 2 and PRDX1 genes were not significantly different (p>0.05) from in vivo produced embryos. When the breed effect was evaluated, Holstein in vivo produced blastocysts presented AQP3, Na/K-ATPase- α 1, PRDX1, and BAX genes down-regulated (p<0.05) while Na/K-ATPase- β 2 and AQP11 genes were not significantly different (p>0.05) from Gyr embryos. For the in vitro produced embryos, only Bax was up-regulated (p<0.05) in Holstein embryos compared with Gyr embryos. Based on those results, for the evaluated genes, it is possible to conclude that there are inherent breed differences in gene expression observed in in vivo produced embryos and that the in vitro production system influences in the relative expression in both breeds, attenuating the inherent breed differences. Other genes should be evaluated for a better understanding of these breeds differences.

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1: Esquema do delineamento experimental utilizado no trabalho, demonstrando a organização dos grupos por raças bovinas e tipos de produção dos blastocistos para posterior extração e amplificação dos RNAs, síntese do cDNA, PCR em Tempo-Real, e análise da expressão relativa..... | 28 |
| Figura 2: Transcrição reversa para sintetizar a primeira fita de cDNA contendo a seqüência promotora T7..... | 32 |
| Figura 3: Síntese da segunda fita do cDNA, convertendo o cDNA em um DNA de dupla fita (dsDNA)..... | 33 |
| Figura 4: Purificação do cDNA, com a remoção de enzimas, sais, excesso de primers e RNAs (especialmente RNA ribossomal)..... | 33 |
| Figura 5: Transcrição <i>in vitro</i> para a síntese do RNAa..... | 34 |
| Figura 6: Purificação do RNAa, com a remoção de enzimas, sais e nucleotídeos não utilizados..... | 34 |
| Figura 7: Curva de dissociação do gene AQP3 resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 83,6°C..... | 42 |
| Figura 8: Curva de dissociação do gene AQP11 resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 75,7°C..... | 43 |
| Figura 9: Curva de dissociação do gene PRDX1 resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 79,7°C..... | 43 |
| Figura 10: Curva de dissociação do gene Na/K-ATPase α 1 resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 80,1°C..... | 43 |
| Figura 11: Curva de dissociação do gene Na/K-ATPase β 2 resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um ponto na temperatura de dissociação de 80,1°C e algumas variações em temperaturas menores..... | 44 |
| Figura 12: Curva de dissociação do gene BAX resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um ponto na temperatura de dissociação de 84,7°C..... | 44 |
| Figura 13: Curva de dissociação do gene H2a resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 79,5°C..... | 44 |

| | |
|---|----|
| Figura 14: Curva de dissociação do gene GAPDH resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 80,7°C..... | 45 |
| Figura 15: Curva de dissociação do gene β -actina resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 88,3°C..... | 45 |
| Figura 16: Expressão relativa (média \pm EPM) dos genes AQP3, AQP11, Na/K-ATPase- α 1, Na/K-ATPase- β 2, PRDX1 e BAX em embriões produzidos <i>in vitro</i> comparados com embriões produzidos <i>in vivo</i> na raça Gir..... | 48 |
| Figura 17: Expressão relativa (média \pm EPM) dos genes AQP3, AQP11, Na/K-ATPase- α 1, Na/K-ATPase- β 2, PRDX1 e BAX em embriões produzidos <i>in vitro</i> comparados com embriões produzidos <i>in vivo</i> na raça Holandesa..... | 49 |
| Figura 18: Expressão relativa (média \pm EPM) dos genes AQP3, AQP11, Na/K-ATPase- α 1, Na/K-ATPase- β 2, PRDX1 e BAX em embriões produzidos <i>in vivo</i> da raça Holandesa comparados com os produzidos <i>in vivo</i> da raça Gir..... | 49 |
| Figura 19: Expressão relativa (média \pm EPM) dos genes AQP3, AQP11, Na/K-ATPase- α 1, Na/K-ATPase- β 2, PRDX1 e BAX em embriões produzidos <i>in vitro</i> da raça Holandesa comparados com os produzidos <i>in vitro</i> da raça Gir..... | 50 |
| Figura 20: Gel de acrilamida (8%) das amostras resultantes da amplificação por PCR em Tempo-Real para o transcrito do gene AQP3 com o fragmento esperado de 136 pares de base..... | 51 |
| Figura 21: Curva de dissociação na temperatura de 81,6°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene AQP3 nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos..... | 51 |
| Figura 22: Gel de acrilamida (8%) das amostras resultantes da amplificação por PCR em Tempo-Real para os transcritos dos genes H2a e Na/K-ATPase α 1 com os fragmentos esperados de 176 e 129 pares de base, respectivamente..... | 52 |
| Figura 23: Curva de dissociação na temperatura de 79,9°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene H2a nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos..... | 53 |
| Figura 24: Curva de dissociação na temperatura de 80,9°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene Na/K-ATPase α 1 nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos..... | 53 |
| Figura 25: Gel de acrilamida (8%) das amostras resultantes da amplificação por PCR em Tempo-Real para os transcritos dos genes Na/K-ATPase β 2 e AQP11 com os fragmentos esperados de 116 e 208 pares de base, respectivamente..... | 54 |

| | |
|--|----|
| Figura 26: Curva de dissociação na temperatura de 80,2°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene Na/K-ATPase β 2 nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos..... | 54 |
| Figura 27: Curva de dissociação na temperatura de 75,7°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene AQP11 nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos..... | 55 |
| Figura 28: Gel de acrilamida (8%) das amostras resultantes da amplificação por PCR em Tempo-Real para o transcrito do gene PRDX1 com o fragmento esperado de 224 pares de base..... | 56 |
| Figura 29: Curva de dissociação na temperatura de 79,4°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene PRDX1 nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos..... | 56 |
| Figura 30: Gel de acrilamida (8%) das amostras resultantes da amplificação por PCR em Tempo-Real para o transcrito do gene BAX com o fragmento esperado de 174 pares de base..... | 57 |
| Figura 31: Curva de dissociação na temperatura de 84°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene BAX nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos..... | 57 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabela 1: Classificação do estágio de desenvolvimento embrionário segundo o Manual da IETS..... | 31 |
| Tabela 2: Classificação da qualidade embrionária segundo o Manual da IETS..... | 31 |
| Tabela 3: Quantificação realizada com 1µl do cDNA obtido após o procedimento de transcrição reversa para cada repetição por grupo..... | |
| Tabela 4: Seqüência dos <i>primers</i> específicos utilizados para o estudo de expressão gênica em embriões bovinos, temperaturas de ligação, tamanho dos produtos e fonte de acesso às seqüências no GenBank ou referência bibliográfica..... | 35 |
| Tabela 5: Quantidade ideal de cDNA e temperatura de dissociação (TD) dos genes analisados para o estudo de expressão gênica em blastocistos bovinos no processo de padronização da PCR em Tempo-Real..... | 41 |
| Tabela 6: Eficiência da reação e coeficiente de correlação (r) para cada gene utilizado para o estudo de expressão gênica em embriões bovinos nas condições padronizadas da PCR em Tempo-Real..... | 42 |
| Tabela 7: Média dos C _t s e coeficiente de variação (CV) por gene para cada um dos grupos de embriões avaliados no experimento de expressão gênica relativa em blastocistos bovinos..... | 46 |
| Tabela 8: Eficiência média das amplificações obtidas por PCR em Tempo-Real nas comparações entre os grupos de blastocistos bovinos para cada gene utilizada para a análise de expressão relativa..... | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQP – Aquaporina

BAX – “*BCL2-associated X protein*”

BCL2 – “*B-cell lymphoma 2*”

Bl – Blastocisto

BSA – “*Bovine Serum Albumin*” – Albumina sérica bovina

Bx – Blastocisto expandido

cDNA – “*complementary DNA*” - DNA complementar

CL – Corpo lúteo

COCs – Complexos *cúmulus*-oócitos

Ct – “*Cycle threshold*” - ciclo limite

EPM – Erro padrão da média

GAPDH – “*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*” - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

H2a – Histona 2a

HSP – *Heat Shock Protein* – Proteína de choque térmico

ICM – Massa celular interna

MOET – múltipla ovulação e transferência de embriões

mRNA – RNA mensageiro

Na/K-ATPase – Bomba de Na⁺ e K⁺ dependente da hidrólise de ATP

Na/K-ATPase α 1 – Na⁺/K⁺-ATPase subunidade alfa 1

Na/K-ATPase β 2 – Na⁺/K⁺-ATPase subunidade beta 2

OPU – “*Ovum pick-up*” – punção folicular orientada por ultra-sonografia

PBS – “*Phosphate-buffered saline*” – Salina tamponada com fosfato

PCR – “*Polymerase chain reaction*” - reação em cadeia da polymerase

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

PRDX – Peroxiredoxina

RNA – ácido ribonucléico

RNAa – RNA antisenso

ROS – Espécies de oxigênio reativo

RT – “*Reverse transcription*” - transcrição reversa

SFB – Soro fetal bovino

TE – Produção de embriões *in vivo* para transferência

SUMÁRIO

| | Página |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 1.1 Importância da produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos..... | 16 |
| 1.2 Características reprodutivas de <i>Bos indicus</i> e <i>Bos taurus</i> | 17 |
| 1.3 Produção de embriões <i>in vivo</i> X <i>in vitro</i> | 19 |
| 1.4 Genes relacionados ao desenvolvimento e sobrevivência de embriões bovinos..... | 21 |
| 1.4.1 Aquaporinas..... | 22 |
| 1.4.2 Na ⁺ /K ⁺ -ATPases..... | 24 |
| 1.4.3 BAX..... | 25 |
| 1.4.4 Peroxiredoxina..... | 26 |
| 2 OBJETIVOS..... | 28 |
| 3 MATERIAL e MÉTODOS..... | 29 |
| 3.1 Delineamento experimental..... | 29 |
| 3.2 Produção dos embriões..... | 30 |
| 3.2.1 <i>In vitro</i> | 30 |
| 3.2.2 <i>In vivo</i> | 31 |
| 3.3 Extração de RNA, amplificação dos mRNA e síntese do cDNA.... | 33 |
| 3.3.1 Extração do RNA total..... | 33 |
| 3.3.2 Amplificação dos mRNAs..... | 34 |
| 3.3.3 Síntese do cDNA..... | 36 |
| 3.4 Desenho dos <i>primers</i> específicos..... | 37 |
| 3.5 Padronização da PCR em Tempo-Real..... | 39 |
| 3.6 Quantificação do cDNA das amostras experimentais por PCR em Tempo-Real..... | 40 |
| 3.7 Análise dos Resultados..... | 41 |

| | |
|--|----|
| 4 RESULTADOS | 43 |
| 4.1 Padronização da PCR em Tempo-Real | 43 |
| 4.2 Quantificação do cDNA das amostras experimentais por PCR em Tempo-Real | 47 |
| 5 DISCUSSÃO | 60 |
| 6 CONCLUSÕES | 66 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 67 |
| ANEXOS (protocolos) | 76 |
| ANEXO A – Extração de RNA (RNeasy Micro Kit – QIAGEN) | 77 |
| ANEXO B – Amplificação de RNA (MessageAmptm II aRNA Amplification Kit – AMBION) | 79 |
| ANEXO C – Transcrição Reversa (Superscripttm III First-Strand Synthesis Supermix – INVITROGEN) | 84 |
| ANEXO D – Gel de Acrilamida (8%) | 86 |

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, várias biotecnologias reprodutivas são utilizadas em todo o mundo com os mais diversos objetivos. Estas técnicas variam desde as mais simples, como a inseminação artificial, até as mais complexas, como a transferência nuclear (ou clonagem). Os estudos que utilizam estas tecnologias incluem o aperfeiçoamento dos protocolos correntes, compreensão das modificações metabólicas que ocorrem durante o desenvolvimento normal de um embrião, seu comportamento mediante situações de estresse (incluindo ambiente de cultivo) e sua resposta epigenética a estes fatores, mais especificamente, alterações no padrão de expressão gênica (ou produção de mRNAs) que podem ter seu efeito no organismo observado após um longo período (KNIJN *et al.*, 2002; LONERGAN *et al.*, 2006; WRENZYCKI *et al.*, 2005).

Dentre as anormalidades, possivelmente causadas por mudanças nos padrões de expressão de mRNAs, podem ser citadas o aumento da taxa de apoptose, alterações no metabolismo celular, problemas de implantação, fenótipos anormais como aumento de peso ao nascimento, alterações no tamanho de órgãos, vários defeitos na placenta e esqueleto, entre outros (LAZZARI *et al.*, 2002; LEYENS, KNOOPS e DONNAY, 2004; RIZOS *et al.*, 2002; WRENZYCKI *et al.*, 2005).

O estudo da origem destas anormalidades é particularmente importante na compreensão das diferenças observadas entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* e entre bovinos de origem taurina e zebuína.

Identificando a origem destas alterações, é possível adequar os sistemas de cultivo e os protocolos de criopreservação. Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar a expressão de genes relacionados com a sobrevivência e desenvolvimento em embriões bovinos de origem taurina (*Bos taurus*) e zebuína (*Bos indicus*) produzidos *in vivo* e *in vitro*.

1.1 IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Bioteχνologias reprodutivas como a inseminação artificial e a transferência de embriões (TE), têm contribuído para a multiplicação de genótipos superiores, acelerando o melhoramento genético bovino. A inseminação artificial tem sido essencial para o estabelecimento de programas de teste de progênie, e a TE para o ganho genético através do aumento de intensidade de seleção e redução do intervalo entre gerações (MEUWISSEN, 1998). Entretanto, a transferência de embriões produzidos *in vivo* possui algumas limitações, como a variabilidade da resposta de doadoras aos tratamentos hormonais e aumento da taxa de consanguinidade quando utilizada em núcleos MOET (múltipla ovulação e transferência de embriões). Essas limitações podem ser contornadas com a utilização de uma biotecnologia reprodutiva mais recente, a produção *in vitro* de embriões (PIVE), cujo principal benefício é aumentar o potencial reprodutivo, que é de grande importância nos programas de melhoramento genético (CAMARGO *et al.*, 2005a; IMAI *et al.*, 2006).

A utilização comercial da PIVE tem aumentado, e atualmente os embriões produzidos *in vitro* representam uma porcentagem considerável do número total de embriões bovinos produzidos mundialmente. Os dados do ano de 2007 indicam que cerca de 823.000 embriões foram produzidos no mundo, seja pela TE seja pela PIVE. Cerca de 578.000 embriões produzidos *in vivo* foram transferidos no mundo, dos quais aproximadamente metade foi transferida a fresco e metade congelada. Em contraste, cerca de 245.000 embriões PIVE foram transferidos no mesmo ano dos quais a maioria (cerca de 90%) foi transferida a fresco (THIBIER, 2008).

Somente no Brasil, durante o ano de 2006, foram transferidos mais de 190.000 embriões produzidos *in vitro*, o que representa 73,8% do total de embriões transferidos, contra aproximadamente 60.000 transferências de embriões produzidos *in vivo*, consagrando a PIVE como a opção para a multiplicação de bovinos no país (VIANA e CAMARGO, 2007). Estes números colocam o Brasil em segundo lugar mundial na produção *in vivo* de embriões bovinos e em primeiro lugar na produção *in vitro*, demonstrando a importância desta técnica para a agropecuária nacional. O aumento na

transferência de embriões PIV bovinos no Brasil se deve ao fato de que a maioria do gado brasileiro é de origem zebuína, conhecido pela produção de um grande número de oócitos, fazendo com que a aspiração folicular e a produção *in vitro* gerem um número expressivo de embriões (NASSER *et al.*, 2008).

1.2 CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE *Bos indicus* E *Bos taurus*

A maior parte do gado zebuino (*Bos indicus*) mundial vive em regiões entre o Trópico de Câncer e o de Capricórnio, onde a nutrição, o balanço térmico, a produção de leite e a reprodução podem ser severamente afetadas por temperaturas e umidade relativa altas. O gado europeu (*Bos taurus*) foi introduzido nos Trópicos por volta do ano 1800, em um esforço para aumentar comparativamente os baixos níveis de produção leiteira do gado zebuino. Entretanto, os animais taurinos podem não ser uma opção viável para a produção de leite em países tropicais devido à sensibilidade ao calor e a ectoparasitos, que gera uma queda na produção. De forma contrária, o gado zebuino é bem adaptado a estas regiões, apresentando maior tolerância ao estresse térmico. Além disso, estes animais são mais fortes e apresentam uma maior resistência aos ectoparasitos encontrados nas áreas tropicais (GORDON, 2004).

Algumas particularidades reprodutivas de *Bos taurus* e *Bos indicus* devem ser consideradas ao se utilizar técnicas de manejo, inseminação artificial, transferência de embriões e aspiração folicular guiada por ultra-sonografia aliada à produção *in vitro* de embriões. Dentre elas podemos citar diferenças no comportamento durante a fase de estro, no desenvolvimento folicular, e na fisiologia do pós-parto (revisado por BARUSELLI, GIMENES e SALES, 2007).

O desenvolvimento folicular de bovinos ocorre em um padrão de ondas, com cada onda caracterizada por um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum por aproximadamente três dias (GINTHER *et al.*, 2003). Destes, apenas um continua seu desenvolvimento

(folículo dominante), enquanto os outros sofrem decréscimo de tamanho (folículos subordinados), estabelecendo-se então, o fenômeno da divergência folicular. Após a divergência, ou o folículo dominante presente no momento da regressão luteal culmina na ovulação, ou torna-se anovulatório (na presença de altos níveis de progesterona), iniciando o processo de atresia e perda da dominância, dando início a uma nova onda de crescimento folicular (revisado por BARUSELLI, GIMENES e SALES, 2007).

Apesar de uma similaridade nos padrões de dinâmica folicular, o gado taurino (*Bos taurus*) e o zebuíno (*Bos indicus*) diferem em vários aspectos de sua fisiologia ovariana, como por exemplo, no número de ondas foliculares, divergência, tamanho máximo, persistência de folículos dominantes, recrutamento folicular, etc. (GORDON, 2004; RHODES *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 1997; VIANA *et al.*, 2000; SARTORELLI *et al.*, 2005).

Estas características parecem estar associadas com a grande variação de resposta superovulatória observada no gado zebuíno (BARUSELLI *et al.*, 2006). Além disso, determinam o maior número de pequenos folículos em crescimento nos ovários destes animais e, conseqüentemente, um maior número de COCs (complexos *cumulus*-oócitos) recuperados por OPU (*ovum pick-up* – punção folicular guiada por ultrassonografia) (VIANA *et al.*, 2004), quando comparados com resultados de *Bos taurus* (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2005). Em outro estudo, Carvalho *et al.* (2008), também descreveram um número maior de folículos sendo recrutados em fêmeas zebuínas por onda de crescimento folicular do que em fêmeas taurinas (cerca de 34 e 25, respectivamente). Esta característica, particularmente, tem influência direta nos resultados obtidos pela técnica de transferência de embriões e de OPU-PIVE (produção de embriões *in vitro* com oócitos puncionados), uma vez que possibilita a coleta de um número maior de folículos, indicando uma vantagem do uso de fêmeas zebuínas sobre taurinas.

Em relação a gametas e embriões, possíveis diferenças entre as raças podem existir, o que deve contribuir para que métodos como a criopreservação, amplamente utilizada, não possua a mesma eficiência para embriões *Bos taurus* e embriões *Bos indicus* (VARAGO *et al.*, 2006; VISINTIN *et al.*, 1999). Em ambientes tropicais, o gado zebuíno possui um melhor desempenho reprodutivo do que o gado taurino, o que pode

estar relacionado com melhor adaptação evolutiva a um ambiente com maior estresse térmico. Quando se compara a produção *in vitro*, os embriões zebuínos tendem a atingir maiores taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, principalmente em períodos sazonais mais quentes, indicando que estes embriões podem possuir uma termotolerância maior do que os taurinos (CAMARGO *et al.*, 2007).

A observação do comportamento de embriões zebuínos e taurinos em ambiente de cultivo *in vitro* sugere que exista alguma forma de regulação em resposta a este sistema que permita, bloqueie ou altere o desenvolvimento embrionário normal. A identificação de variações nos padrões de expressão gênica pode ser uma forma de avaliar se variações ao nível molecular podem estar envolvidas na manifestação de alterações morfológicas envolvidas com o ambiente de produção *in vitro* que sejam relacionadas com a raça dos animais utilizados para obtenção dos oócitos.

1.3 PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VIVO* X *IN VITRO*

A produção de embriões *in vitro* é um processo constituído essencialmente por três passos, a maturação do oócito, a fecundação e o subsequente cultivo do zigoto. As diferenças destes embriões produzidos *in vitro* para os produzidos *in vivo* podem se originar em qualquer um destes passos (LONERGAN *et al.*, 2003a). Estas diferenças provavelmente são induzidas por vários fatores, como raça, qualidade do oócito, ambiente folicular, fecundação e ambiente de cultivo embrionário. Os embriões produzidos *in vitro* geralmente possuem uma coloração mais escura, formação precoce da blastocela sem a compactação apropriada, e menor número de células do que os embriões que se desenvolvem *in vivo*, alterações na relação massa celular interna (ICM) e células do trofoblasto, na frequência de apoptose, na tolerância à criopreservação, na expressão gênica e metabolismo celular (CAMARGO *et al.*, 2006; KNIJN *et al.*, 2002; LONERGAN *et al.*, 2006). Diversos transcritos que parecem estar envolvidos de forma importante no desenvolvimento pré-implantação são afetados pelo

tipo de meio de cultivo e pelo tipo de suplemento protéico (KNIJN *et al.*, 2002). Mesmo pequenas quantidades de transcritos podem ser biologicamente significantes se estiverem envolvidos na regulação gênica ou participarem de cascatas de sinalização (WRENZYCKI *et al.*, 2005).

O desenvolvimento pré-implantação é caracterizado por passos biológicos distintos, incluindo a primeira clivagem (divisão), ativação do genoma embrionário, compactação e formação do blastocisto com a derivação em duas linhagens celulares, a massa celular interna e as células do trofoderma. Estas mudanças requerem a expressão bem coordenada de genes (LONERGAN *et al.*, 2006; WRENZYCKI *et al.*, 2005).

O estágio de blastocisto é essencial no desenvolvimento embrionário inicial, e é dependente da formação de junções que selam os espaços intercelulares na camada de células externa do trofoblasto levando a formação de uma cavidade repleta de fluido no seu interior, denominada blastocele (OFFENBERG e THOMSEN, 2005). Segundo Knijn *et al.* (2002), blastocistos derivados de oócitos maturados com protocolos diferentes, mas cultivados de forma idêntica, não demonstraram diferenças significativas em relação à expressão dos genes avaliados. Desta forma, o ambiente de cultivo (pós-fecundação) pode estar relacionado com a alteração do padrão de expressão gênica no embrião, que por sua vez pode ter implicações na qualidade e viabilidade do blastocisto (LONERGAN *et al.*, 2006; RIZOS *et al.*, 2002). Além disso, após a transferência, os embriões produzidos *in vitro* se apresentam com menor potencial de implantação e desenvolvimento que os embriões produzidos *in vivo* e frequentemente tem sido associados com anormalidades fetais e neonatais (LONERGAN e FAIR, 2008).

Além das características citadas acima, os embriões bovinos produzidos *in vitro* possuem menor capacidade de sobrevivência pós-criopreservação e de desenvolvimento pós-transferência do que embriões produzidos *in vivo* (DOBRINSKY, 2002; GOOSSENS *et al.*, 2007; NIEMANN e WRENZYCKI, 2000; WARZYCH *et al.*, 2007, LONERGAN e FAIR, 2008), apesar de várias melhorias obtidas nos métodos de criopreservação utilizados (VAJTA, 2000). Mesmo com as dificuldades, a criopreservação de embriões produzidos *in vitro*, derivados de animais de alto valor

genético, tem permitido que embriões geneticamente superiores sejam armazenados indefinidamente.

A identificação de variações nos padrões de expressão gênica em embriões produzidos *in vitro* quando comparados com embriões obtidos *in vivo* pode ser uma ferramenta útil para auxiliar no direcionamento das modificações que devem ser realizadas no método de produção para que as alterações morfológicas observadas entre embriões produzidos de formas diferentes seja reduzida.

1.4 GENES RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS

Imagina-se que cerca de 10.000 genes precisam ser expressos de forma coordenada para que o desenvolvimento pré-implantacional e fetal ocorram de maneira regular (NIEMANN e WRENZYCKI, 2000). Entretanto, até o momento, apenas cerca de 150 genes foram avaliados em estudos de alteração dos padrões de expressão de mRNA em oócitos e embriões bovinos (GOOSSENS *et al.*, 2007; KNIJN *et al.*, 2005; RIZOS *et al.*, 2002; WRENZYCKI, HERRMANN e NIEMANN, 2007).

Alguns genes podem estar relacionados com a formação, sobrevivência e posterior desenvolvimento de blastocistos bovinos, como os envolvidos no transporte de água e solutos (Aquaporinas), formação da cavidade do blastocisto (Na^+/K^+ -ATPases), apoptose (BAX) e resposta a estresse celular (Peroxiredoxina 1). Técnicas para análise de expressão gênica têm se tornado ferramentas importantes na identificação de transcritos relacionados à qualidade embrionária, permitindo a utilização do mRNA para avaliar de forma indireta esta qualidade, gerando dados sobre o comportamento dos embriões em um determinado sistema de cultivo. Desta forma, diferenças na abundância de determinados transcritos entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* podem auxiliar à identificação da normalidade e ajudar a aperfeiçoar as

condições de cultivo dos embriões produzidos *in vitro* (GOOSSENS *et al.*, 2007; WARZYCH *et al.*, 2007).

1.4.1 Aquaporinas

Nas células, os ambientes intra e extracelular são delimitados pela membrana plasmática, formada basicamente por uma bicamada fosfolipídica onde a água pode permear lentamente por difusão simples. Além da movimentação passiva, o trânsito de água pela membrana pode ocorrer por meio de canais formados por proteínas transmembranas e especializados nesta função, denominados aquaporinas (AQPs). Estes canais podem ser encontrados em diversos organismos, desde bactérias a plantas e animais. Além de água, as AQPs podem facilitar o transporte de pequenas moléculas como o glicerol, uréia e até mesmo íons. Várias isoformas destas proteínas são expressas diferencialmente em células e tecidos, e sua identificação em momentos específicos do desenvolvimento podem levar a uma melhor compreensão da importância de cada AQP no transporte de água e pequenos solutos e ainda na sua relação com sobrevivência, desenvolvimento, resposta a estímulos, etc. (OFFENBERG *et al.*, 2000; TAKATA, MATSUZAKI e TAJIKA, 2004).

A identificação e caracterização das proteínas formadoras de canais de água e seus homólogos possibilitou o agrupamento destas em uma grande família, que por sua vez pode ser dividida em três subfamílias: as aquaporinas propriamente ditas, que permitem a passagem apenas de água (AQPs 0, 1, 2, 4, 5, 6 e 8); e as “aquagliceroporinas”, que permitem a passagem de água, glicerol, uréia, purinas, pirimidinas, carbaminas e pequenos solutos (AQPs 3, 7, 9 e 10) (revisado por TAKATA, MATSUZAKI e TAJIKA, 2004); e as “aquaporinas subcelulares” ou “superquaporinas” (AQPs 11 e 12), que apresentam baixa homologia com outras AQPs e não se encaixam nas funções de transporte já relatadas para as demais AQPs (GORELICK *et al.*, 2006; OKADA *et al.*, 2008). Segundo Morishita *et al.* (2005), em camundongos a AQP11 pode

ser localizada no retículo endoplasmático e os resultados encontrados neste estudo sugerem que este gene deve desempenhar um papel importante na homeostase vesicular. No trabalho de Itoh *et al.* (2005), a AQP12 foi identificada como se localizando em organelas intracelulares de células de mamíferos cultivadas *in vitro* e não na membrana plasmática, como ocorre com as demais aquaporinas. Atualmente não existem estudos disponíveis sobre os níveis de expressão da AQP11 e AQP12 e os trabalhos têm sido conduzidos para determinar a função da proteína (GORELICK *et al.*, 2006; MORISHITA *et al.*, 2005; OKADA *et al.*, 2008).

Algumas aquaporinas têm sido relacionadas com a formação da blastocela, já que permitem que a água possa fluir rapidamente pela membranas em direção ao gradiente osmótico (BARCROFT *et al.*, 2003; EDASHIGE, SAKAMOTO e KASAI, 2000; OFFENBERG e THOMSEN, 2005; WATSON, NATALE e BARCROFT, 2004). Como a água e pequenos solutos como o glicerol podem ter sua passagem facilitada, a presença destes canais pode auxiliar a movimentação de crioprotetores nos processos de criopreservação, podendo viabilizar um aumento nas taxas de sobrevivência e até de gestação.

Embriões bovinos produzidos *in vivo*, que possuem maiores taxas de sobrevivência após a criopreservação do que embriões PIVE, expressam maiores quantidades de transcritos da aquaporina 3 (CAMARGO *et al.*, 2005b). Esse último dado sugere que a expressão gênica de aquaporinas pode estar envolvida na sobrevivência embrionária após criopreservação. Uma diferença na expressão de genes desta família em embriões taurinos e zebuínos poderia sugerir uma explicação para maior capacidade de sobrevivência à criopreservação dos embriões de *Bos taurus* quando comparados com embriões de *Bos indicus* (*in vivo* ou *in vitro*).

1.4.2 Na⁺/K⁺-ATPases

A formação do blastocisto (ou cavitação) é dependente da diferenciação do trofoderma e iniciada após o estabelecimento de gradientes de íons e acúmulo osmótico de líquidos através da membrana celular (BARCROFT *et al.*, 2004). A bomba de sódio e potássio, presente na membrana plasmática desempenha um papel fundamental na diferenciação do trofoderma e no processo de cavitação do embrião. Esta enzima está presente em todos os estádios durante a fase de desenvolvimento pré-implantação e utiliza a energia proveniente da hidrólise do ATP para transportar Na⁺ e K⁺ através da membrana em direções opostas, com o objetivo de manter elevado o gradiente eletroquímico de ambos os cátions (MACPHEE *et al.*, 2000).

As Na⁺/K⁺-ATPases consistem em uma subunidade catalítica α e uma subunidade β não catalítica e glicosilada, cada uma codificada por famílias multigênicas. A subunidade β é necessária para a maturação funcional e estrutural da subunidade α . A formação do blastocisto envolve o estabelecimento de um gradiente de íons através do trofoderma mediado por Na⁺/K⁺-ATPases que permite a passagem de água através dos canais formados por aquaporinas. O acúmulo de líquido na blastocele é essencial para a diferenciação das células da massa celular interna (ICM) e do trofoderma (GOOSSENS *et al.*, 2007; MADAN, ROSE e WATSON, 2007). Tanto a subunidade α quanto a β já foram identificadas em embriões bovinos no estágio de pré-implantação (BETTS, BARCROFT e WATSON, 1998; BETTS *et al.*, 1997). Alterações na expressão destes genes pode estar relacionada com falhas na expansão da blastocele e/ou na re-expansão após um procedimento de criopreservação, o que pode levar a morte do embrião, já que crioprotetores como o etilenoglicol são tóxicos para as células e a re-expansão ineficiente não permite a entrada suficiente de água para substituir a solução crioprotetora.

1.4.3. BAX

A apoptose, ou morte celular programada, pode ser definida como um processo regulatório complexo que controla a morte celular por mecanismos intrínsecos (ERICKSON, 1997). A família de proteínas Bcl-2 é uma das responsáveis pela regulação da maquinaria apoptótica. Os membros da família Bcl-2 atuam como reguladores de apoptose nas mitocôndrias controlando a permeabilidade da membrana e a liberação do citocromo c, que é uma proteína solúvel em água com carga positiva que se encontra no espaço intermembrana e atua na cadeia respiratória (JOHNSON, 2003; ZIMMERMANN, BONZON e GREEN, 2001). Os membros desta família podem ser subdivididos em duas categorias de acordo com sua função: (1) membros anti-apoptóticos, como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1 (Bfl-1), NR-13, e Boo (Diva), os quais exercem atividade anti-morte celular, e (2) membros pró-apoptóticos, como Bax, Bak, and Bok (Mtd), Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Hrk (DP5), Bnip3, BimL, e Noxa (ZIMMERMANN, BONZON e GREEN, 2001).

Os membros da família Bcl-2 são considerados os principais reguladores de apoptose nas mitocôndrias controlando a permeabilidade da membrana e a liberação do citocromo c, que é uma proteína solúvel em água com carga positiva que se encontra no espaço intermembrana e atua na cadeia respiratória. Os domínios homólogos conservados junto a regiões transmembrana são responsáveis, coletivamente, pelas interações proteína-proteína, assim como pela habilidade de formar poros ou canais de íons nas membranas intracelulares. Enquanto, os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, promovem a liberação do citocromo c mitocondrial, os membros anti-apoptóticos normalmente agem de forma a prevenir esta perturbação (JOHNSON, 2003; ZIMMERMANN, BONZON e GREEN, 2001).

A proteína Bax se localiza no citosol (BUDD *et al.*, 2004; ZIMMERMANN, BONZON e GREEN, 2001). Durante a apoptose, ela é ativada; provavelmente por uma mudança conformacional, e translocada para a mitocôndria onde pode então formar canais e liberar as proteínas contidas dentro do espaço intermembrana, incluindo uma

proteína-chave, o citocromo c. Esta proteína é codificada por um gene nuclear, mas quando é importada para a mitocôndria, se liga a um grupo heme e se torna um holocitocromo c, e é apenas esta forma que induz a ativação da caspase, que é a principal proteína mediadora da apoptose (ZIMMERMANN, BONZON e GREEN, 2001).

A presença de blastômeros apoptóticos em embriões mamíferos em estágio de pré-implantação tem sido descrita em várias espécies, incluindo camundongos, ovinos, equinos, bovinos, suínos, e humanos. Tais células são observadas predominantemente na massa celular interna, tanto em embriões produzidos *in vivo* quanto *in vitro*. Alguns estudos demonstraram que as condições de cultivo *in vitro* podem afetar a extensão da apoptose (GJØRRET *et al*, 2007; WARZYCH *et al*, 2007).

1.4.4. Peroxiredoxina

O metabolismo aeróbico basal leva a uma produção de espécies de oxigênio reativo (ROS) como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxil (OH^\cdot). Além disso, as técnicas de produção *in vitro* expõem os embriões, que não se beneficiam da proteção antioxidante materna, ao oxigênio atmosférico (20% de O_2 em vez de cerca de 7% no oviduto), a luz visível, e a vestígios de metais pesados no meio de cultivo. Todos estes fatores são responsáveis por um aumento na produção de ROS, que pode induzir efeitos prejudiciais nos embriões, como quebras do DNA, danos mitocondriais, bloqueio do desenvolvimento, e apoptose (LEYENS, KNOOPS e DONNAY, 2004; revisado por GUÉRIN, EI MOUATASSIM e MÉNÉZO, 2001).

Para ajustar os níveis de ROS e para a proteção contra o estresse oxidativo, oócitos e embriões possuem diversos sistemas antioxidantes, entre eles a glutathione e os antioxidantes enzimáticos clássicos incluindo as superóxido dismutases, catalase, e glutathione peroxidases (revisado por GUÉRIN, EI MOUATASSIM e MÉNÉZO, 2001). As peroxiredoxinas (PRDXs) formam a última família de enzimas antioxidantes descoberta (CHAE, CHUNG e RHEE, 1994). Em mamíferos esta família é composta por seis isoformas, denominados de PRDX1 a PRDX6 (LEYENS, DONNAY e KNOOPS, 2003) e

todas diferem em sua localização celular, com as PRDX1, 2 e 6 localizadas principalmente no citosol, a PRDX3 restrita à mitocôndria, a PRDX4 presente no retículo endoplasmático e a PRDX5 distribuída no núcleo, mitocôndria e peroxissomos (revisado por ABBAS, BRETON e DRAPIER, 2008). Segundo Leyens, Donnay e Knoop (2004), os transcritos que codificam para as seis isoformas de PRDX podem ser detectadas durante o desenvolvimento de embriões bovinos, apresentando diferentes padrões de expressão, com algumas peroxiredoxinas apresentando um perfil contínuo (PRDX1 e PRDX5), uma expressão tardia (PRDX4) ou uma expressão interrompida no período da ativação do genoma embrionário.

Pouco se sabe sobre a regulação da expressão gênica das PRDXs. Apenas a PRDX1 têm sido objeto de profunda investigação neste caso. O que se sabe atualmente é que a expressão da PRDX1 é sobre-regulada em resposta a vários tipos de estresse, incluindo estímulos oxidativos (revisado por ABBAS, BRETON e DRAPIER, 2008).

2 OBJETIVOS

Geral:

Avaliar efeitos dos sistemas de produção, *in vitro* e *in vivo*, em blastocistos bovinos e efeitos de raças bovinas, Gir (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos Taurus*) por meio da expressão de genes candidatos possivelmente relacionados com a sobrevivência e o desenvolvimento embrionários.

Específicos:

- 1) Avaliar efeitos dos sistemas de produção (*in vivo* x *in vitro*) por meio de variações na expressão de transcritos de genes candidatos possivelmente relacionados à formação da cavidade do blastocisto (Na/K-ATPase α 1, Na/K-ATPase β 2), apoptose (BAX), estresse celular (PRDX1), transporte de água e solutos (AQP1, AQP3 e AQP11), que podem ser importantes para a formação, sobrevivência e posterior desenvolvimento em blastocistos bovinos produzidos a partir de progenitores das raças taurina (Holandesa) e zebuína (Gir);
- 2) Avaliar efeitos de raças (Gir x Holandesa) por meio de variações na expressão de transcritos de genes candidatos possivelmente relacionados à formação da cavidade do blastocisto (Na/K-ATPase α 1, Na/K-ATPase β 2), apoptose (BAX), estresse celular (PRDX1), transporte de água e solutos (AQP1, AQP3 e AQP11), que podem ser importantes para a formação, sobrevivência e posterior desenvolvimento em blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido nas dependências dos Laboratórios de Reprodução Animal e de Genética Molecular em Juiz de Fora, MG, no Campo Experimental de Coronel Pacheco em Coronel Pacheco, MG, e no Campo Experimental de Santa Mônica em Valença, RJ, pertencentes à Embrapa Gado de Leite. Foram produzidos embriões *in vitro* e *in vivo* das raças Gir e Holandesa, representando animais *Bos indicus* e *Bos taurus*, respectivamente.

Foram realizadas extrações do RNA de conjuntos de cinco embriões por grupo (Gir-*in vivo*; Gir-*in vitro*; Holandês-*in vivo*; Holandês-*in vitro*), no estágio de blastocisto, com três repetições cada, para análise da expressão gênica por quantificação por PCR em Tempo Real (Figura 1).

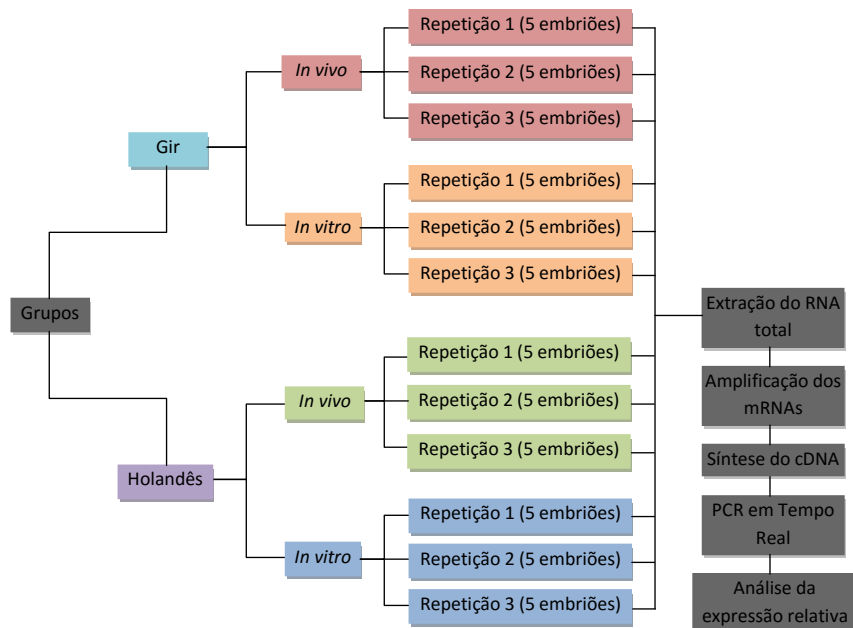


Figura 1: Esquema do delineamento experimental utilizado no trabalho, demonstrando a organização dos grupos por raças bovinas e tipos de produção dos blastocistos para posterior extração e amplificação dos RNAs, síntese do cDNA, PCR em Tempo-Real, e análise da expressão relativa.

Os dados foram utilizados de forma a avaliar o efeito das raças entre os grupos de embriões produzidos *in vitro* (Holandês e Gir) e entre os grupos produzidos *in vivo* (Holandês e Gir), e de forma a avaliar o efeito do sistema de produção (*in vivo* e *in vitro*) dentro de cada raça.

3.2 Produção dos embriões

Os animais utilizados para a produção *in vivo* dos embriões e para a aspiração dos folículos a serem utilizados no processo de produção *in vitro* eram mantidos no Campo Experimental de Coronel Pacheco em Coronel Pacheco, MG, e no Campo Experimental de Santa Mônica em Valença, RJ, pertencentes à Embrapa Gado de Leite. O experimento foi conduzido de Fevereiro de 2007 a Dezembro de 2008. As vacas utilizadas para a produção dos embriões, seja para a coleta por lavagem intra-uterina dos embriões produzidos *in vivo*, seja para a aspiração dos oócitos por punção folicular guiada por ultra-sonografia para a produção *in vitro* dos embriões, apresentavam média de escore condição corporal de $2,77 \pm 0,64$ (classificadas segundo EDMONSON *et al.*, 1989), e idade média de $5,38 \pm 1,50$ anos.

3.2.1 *In vitro*

Foram utilizados oócitos de vacas das raças Holandesa e Gir aspirados por punção utilizando aparelho de ultra-sonografia (Scanner 100S, Pie-Medical, Holanda) equipado com um transdutor setorial intravaginal de 7,5 MHz e uma guia para punção folicular. O aspirado folicular foi recuperado em um filtro coletor com malha de 80μ (Millipore, Billerica, MA, EUA) contendo PBS (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) acrescido de 0,1% de BSA. O líquido aspirado foi depositado em placas de Petri com meio *Talp-Hepes* (GORDON, 2003) para seleção morfológica através de microscópio estereoscópio, e classificados morfológicamente em função do número de camadas de células da granulosa (VIANA *et al.*, 2004). Após a seleção, os complexos *cumulus-*

oócitos (COCs) foram maturados *in vitro* em meio TCM-199 (Nutricell), acrescido de 10% de soro de vaca em cio e 20µg/ml de FSH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), e incubados a 5% de CO₂, 38,5 °C e 95% de umidade por 24 horas.

A produção dos embriões para ambas as raças foi realizada conforme metodologia descrita por Camargo *et al.* (2005a). Resumidamente, após a maturação os oócitos foram fecundados com espermatozóides bovinos, previamente selecionados através do método de gradiente de percoll 45% e 95% (Nutricell). A fecundação *in vitro* foi realizada em meio *Fert-TALP* (GORDON, 2003) acrescido de heparina, com concentração de $2,0 \times 10^6$ espermatozóides/mL por período aproximado de 22 horas, sob as mesmas condições atmosféricas da maturação. Após o período de fecundação, os presumíveis zigotos foram cultivados em meio de cultivo CR2aa (WILKINSON *et al.*, 1996) adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell) e em co-cultura com células do *cumulus* oriundas dos próprios oócitos. O cultivo foi realizado nas mesmas condições da fecundação. Três dias após a fecundação, 50% do meio foi renovado. No sétimo dia do cultivo (D7), os embriões classificados segundo Manual da *International Embryo Transfer Society* (IETS; STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998) (Tabelas 1 e 2) como blastocistos (BI) e blastocistos expandidos (Bx) de grau I e II foram transferidos para criotubos e congelados em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA.

3.2.2 *In vivo*

Os animais foram superovulados utilizando-se um protocolo comercial, baseado no controle da fase luteal pela inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®], Pfizer, Hamilton, New Zeland), na sincronização da emergência folicular pela aplicação de benzoato de estradiol (RIC-BE – Syntex, Buenos Aires, Argentina), e na indução de ovulações múltiplas pela administração de hormônio folículo estimulante (FSH - Pluset[®], Callier, Barcelona, Espanha). Utilizou-se uma dose de 200 a 400 U.I. de FSH por animal, ajustada em função da raça, peso e histórico prévio de resposta, diluída em 10 mL de solução salina estéril, administrada em um esquema de oito aplicações com doses decrescentes, via intramuscular. No momento da aplicação da 5^a dose de FSH, cada doadora recebeu 500 mcg de cloprostenol (Ciosin[®], Coopers do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), por via intramuscular, visando à lise de corpos lúteos

eventualmente presentes. A observação visual de estro foi realizada de forma contínua a partir da aplicação da última dose de hormônio. As doadoras foram inseminadas 12 e 24 horas após o início da manifestação do estro, com uma dose de sêmen por inseminação.

As coletas de embriões foram realizadas sete dias após a última inseminação, por meio de lavagem intra-uterina. Cada corno uterino foi lavado com aproximadamente 500 mL de PBS (Nutricell). O líquido recuperado foi passado por um filtro coletor com poros de 0,2 micras (Millipore) apropriado que, após a coleta, teve seu conteúdo transferido para placas de Petri, onde se fez a identificação e classificação dos embriões segundo os mesmos critérios adotados para os embriões produzidos *in vitro* (Tabelas 1 e 2). Os embriões classificados como blastocistos foram congelados em nitrogênio líquido e os que não se encontravam neste estágio foram transferidos para placas contendo meio de cultivo CR2aa adicionado de 10% de SFB (Nutricell) e incubados a 5% de CO₂, 38,5°C e 95% de umidade por, no máximo, 24h.

Tabela 1: Classificação do estágio de desenvolvimento embrionário segundo o Manual da IETS (adaptado de STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998).

| Classificação | Descrição |
|----------------------|---|
| Código 1 | Oócito não fecundado ou embrião de uma célula |
| Código 2 | Embriões com 2 a 16 células |
| Código 3 | Mórula inicial |
| Código 4 | Mórula |
| Código 5 | Blastocisto inicial |
| Código 6 | Blastocisto |
| Código 7 | Blastocisto expandido |
| Código 8 | Blastocisto eclodido |
| Código 9 | Blastocisto em expansão |

Tabela 2: Classificação da qualidade embrionária segundo o Manual da IETS (adaptado de STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998).

| Classificação | Descrição |
|---------------|---|
| Grau I | Excelente ou bom: massa embrionária simétrica com blastômeros individuais, que são uniformes em tamanho, cor e densidade. Este embrião é consistente com seu estágio esperado de desenvolvimento. Irregularidades devem ser relativamente menores e ao menos 85% do material celular deve ser de massa embrionária viável intacta. A zona pelúcida deve ser lisa e não ter superfícies côncavas ou planas. |
| Grau II | Regular: irregularidades moderadas na forma geral de massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 50% do material celular devem compor uma massa embrionária viável, intacta. |
| Grau III | Pobre: irregularidades maiores na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 25% do material celular devem formar uma massa embrionária viável, intacta. |
| Grau IV | Morto ou degenerado: embriões em degeneração, oócitos ou embriões de uma célula: não viáveis. |

3.3 Extração de RNA, amplificação dos mRNA e síntese do cDNA

3.3.1 Extração do RNA total

A extração do RNA foi realizada utilizando-se o kit comercial *RNeasy Micro kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, a lise das células foi realizada por tampão RLT acrescido de 10% de β -Mercaptoetanol (β -ME). O lisado foi homogeneizado, acrescido de etanol 70% e filtrado. Para lavagem foi adicionado tampão RW1. Em seguida, foi realizada a incubação com solução de DNase por 15 min. Após este período ocorreu novamente a lavagem com o tampão RW1 e depois com o tampão RPE. Logo após foi feita a adição de etanol a 80% na coluna e centrifugação para secar a membrana onde se encontrava o RNA. Para eluição, foram utilizados 12 μ L de água RNase-free, gerando um volume final de aproximadamente 11 μ L.

3.3.2 Amplificação dos mRNAs

Devido a pequena quantidade de RNA observada nos blastocistos (~ 30ng/μl em um total de 11μl) durante os testes para a padronização do processo de extração, foi necessária a realização do procedimento de amplificação do RNA com o kit comercial *MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit* (Ambion, Austin, TX, EUA) de acordo com as especificações do fabricante para a obtenção de um volume total de 20μl com concentração aproximada de 70ng/μl. Este procedimento foi descrito por Ushizawa *et al* (2004) como eficiente na obtenção de aRNA amplificado, podendo ser utilizado como material representativo do cDNA. De forma breve, a reação contendo 11 μL de RNA e 1 μL do *primer* T7 Oligo (dT), contendo uma sequência promotora para T7 RNA polimerase, foi incubada por 10 min a 70°C. Em seguida foram adicionados 8 μL do *mix* de reação (dNTP mix, RNase *inhibitor*, *ArrayScript* e 10X *First strand buffer*) para a síntese da primeira fita de cDNA (Figura 2). Esta reação foi incubada por 2h a 42°C.

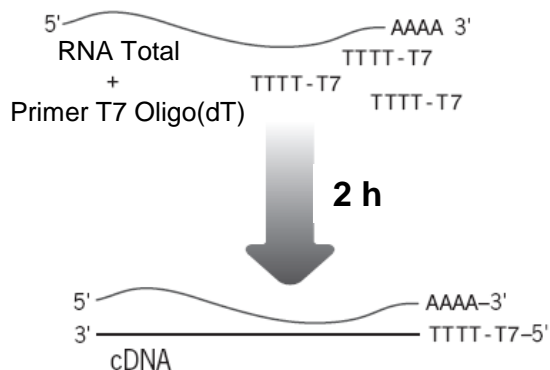


Figura 2: Transcrição reversa para sintetizar a primeira fita de cDNA contendo a sequência promotora T7 (Modificado de *MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit*, 2006).

Após este período, 80 μL de um segundo *mix* de reação (água nuclease-free, 10X *Second strand buffer*, dNTP mix, DNA polimerase e RNase H) foram adicionados para a síntese da segunda fita de cDNA (Figura 3). Esta reação foi incubada por 2h a 16°C.

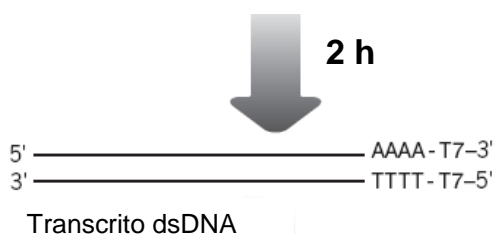


Figura 3: Síntese da segunda fita do cDNA, convertendo o cDNA em um DNA de dupla fita (dsDNA) (Modificado de *MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit*, 2006).

Em seguida foi feita a purificação do cDNA para a remoção de sais, enzimas, excesso de *primers* e RNAs (especialmente RNA ribossomal), acrescentando tampão de ligação ao cDNA, centrifugando, acrescentando tampão de lavagem, novamente centrifugando, e eluindo o cDNA com 10 μ L de água nuclease-free por duas vezes, gerando um volume de 20 μ L (Figura 4).

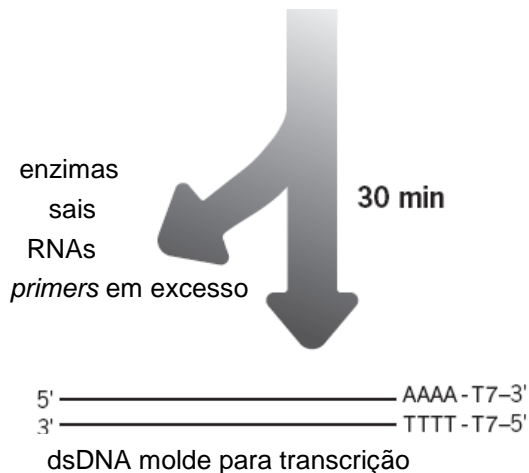


Figura 4: Purificação do cDNA, com a remoção de enzimas, sais, excesso de primers e RNAs (especialmente RNA ribossomal) (Modificado de MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit, 2006).

Após este procedimento, foram adicionados 24 μ L de um terceiro *mix* de reação contendo nucleotídeos, tampões e T7 RNA polimerase (T7 ATP, T7 CTP, T7 GTP, T7 UTP, T7 10X *reaction buffer* e T7 *enzyme mix*) ao volume de cDNA para a síntese do RNA antisenso (RNAa) pela transcrição *in vitro*, e incubados por 5h a 37°C (Figura 5). Nesta etapa ocorre a amplificação linear dos mRNAs, uma vez que a transcrição acontece a partir da sequência promotora e o produto transcrito não a possui para que ocorra o reconhecimento pela RNA polimerase.

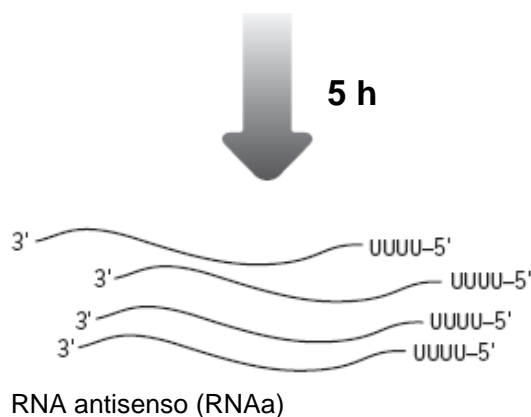


Figura 5: Transcrição *in vitro* para a síntese do RNAa (Modificado de MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit, 2006).

Em seguida foi realizada a purificação do RNAa, acrescentando tampão de ligação e etanol 100% ao RNAa, centrifugando, acrescentando tampão de lavagem, novamente centrifugando, e eluindo o RNAa com 100 μ L de água nuclease-free pré-aquecida, finalmente adicionando NH_4OAc e etanol 100%. Foi realizada uma incubação por 30 min a -20°C . Após este período foi feita uma centrifugação, remoção do supernadante, e lavagem do pellet com etanol a 70%, novamente uma centrifugação, descarte do supernadante e o *pellet* foi mantido em temperatura ambiente para secar (Figura 6). Este *pellet* foi então ressuspendido com 20 μ L de água RNase-free. O volume final obtido foi de 20 μ L.

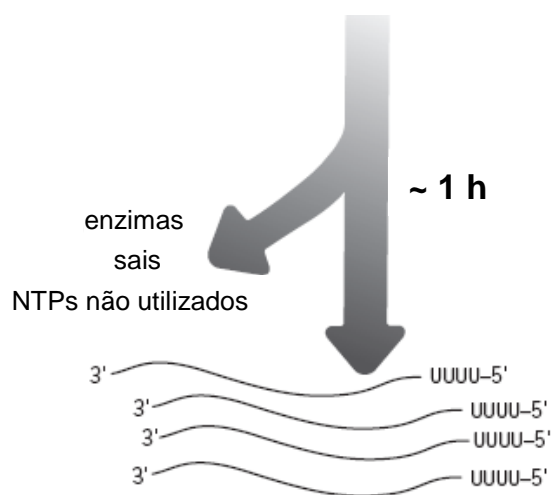


Figura 6: Purificação do RNAa, com a remoção de enzimas, sais e nucleotídeos não utilizados (Modificado de MessageAmpTM II aRNA Amplification Kit, 2006).

3.3.3 Síntese do cDNA

A transcrição reversa para a síntese do cDNA foi realizada com o kit comercial *SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, 4 μ L ($\sim 70\text{ng}/\mu\text{L}$) de RNAa foram utilizados em cada reação de síntese de cDNA. Uma reação contendo RNAa, *primer* hexâmero aleatório, tampão de ligação e água livre de RNase/DNase foi incubada por 5 min a 65°C . Em seguida, 12 μ L de um mix (2X First-Strand reaction mix e SuperScript III/ RNaseOUT Enzyme mix) foi adicionado à reação e esta foi incubada a 25°C por 10 min, 50°C por 50min e 85°C por 5 min. O volume final foi de 20 μ L de cDNA por reação, permanecendo estocado a -80°C até posterior utilização. As quantificações do cDNA obtido de cada repetição por grupo foram realizadas utilizando

1µl de material no aparelho espectrofotômetro nd-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA) e estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Quantificação realizada com 1µl do cDNA obtido após o procedimento de transcrição reversa para cada repetição por grupo.

| Grupo | Quantificação do cDNA |
|-----------------|-----------------------|
| FIV | |
| Gir Repetição 1 | 859,2 ng/µL |
| Gir Repetição 2 | 810,6 ng/µL |
| Gir Repetição 3 | 514,9 ng/µL |
| Hol Repetição 1 | 838,9 ng/µL |
| Hol Repetição 2 | 886,5 ng/L |
| Hol Repetição 3 | 1029,1 ng/µL |
| TE | |
| Gir Repetição 1 | 781,9 ng/µL |
| Gir Repetição 2 | 776 ng/µL |
| Gir Repetição 3 | 826 ng/µL |
| Hol Repetição 1 | 840,2 ng/µL |
| Hol Repetição 2 | 776,2 ng/µL |
| Hol Repetição 3 | 841,5 ng/µL |

3.4 Desenho dos *primers* específicos

Com exceção do *primer* para os transcritos do gene PRDX1, que foi obtido a partir de referência bibliográfica (MOUROT *et al.*, 2006), os *primers* foram desenhados a partir de sequências disponíveis no banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando o programa *Prime3* (ROZEN e SKALETSKY, 2000), sintetizados pela Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EUA) e estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Seqüência dos *primers* específicos utilizados para o estudo de expressão gênica em embriões bovinos, temperaturas de ligação, tamanho dos produtos e fonte de acesso às seqüências no GenBank ou referência bibliográfica.

| Produto | Seqüência (5'-3') do <i>primer</i> | Temperatura de ligação | Tamanho do produto (pb) | Nº de acesso no GenBank ou Ref. bibliográfica |
|------------------------|---|------------------------|-------------------------|---|
| AQP1 | F – 5' GCACAATTTCCAGGACCACT 3' R – 5' GTCGGCATCCAGGTCATACT 3' | 52°C | 166 | NM_174702 |
| AQP3 | F – 5' ACCGATCTAGCCCCTCATCT 3' R – 5' CCAACTCCACCGACAGAATC 3' | 52°C | 136 | NM-001079794 |
| AQP11 | F – 5' TGGCACTTTCACCTGCATTTTC 3' R – 5' CATCCAGCTTGACTGTCCTG 3' | 52°C | 208 | XM_587121 |
| PRDX1 | F – 5' ATGCCAGATGGTCAGTTCAAG 3' R – 5' CCTTGTTTCTTGGGTGTGTTG 3' | 52°C | 224 | AF305561 (MOUROT <i>et al.</i> , 2006) |
| Na/K-ATPase α 1 | F – 5' TGCTGCTTTCCTTTCCTACTG 3' R – 5' AGCTTCCGGACTTCGTCATA 3' | 52°C | 129 | NM_001076798 |
| Na/K-ATPase β 2 | F – 5' AACCGGGTCATCAGCTTCTA 3' R – 5' CCGTTTGCAGGGAACATAAC 3' | 52°C | 116 | NM_174677 |
| BAX | F – 5' TTTTGCTTCAGGGTTTCATCCAGGA 3' R – 5' CAGCTGCGATCATCC TCTGCA G 3' | 60°C | 174 | NM_173894 |
| H2a | F – 5' GCCATCCTGGAGTACCTCAC 3' R – 5' TGGATGTGTGGAATGACACC 3' | 52°C | 176 | NM_174809 |
| GAPDH | F – 5' CAGGAGCACGAGAGGAAGAGTT 3' R – 5' GGCCTTAGAGATGGAAACATGTG 3' | 60°C | 102 | NM_001034034 |
| β -actina | F – 5' GACATCCGCAAGGACCTCTA 3' R – 5' ACATCTGCTGGAAGGTGGAC 3' | 52°C | 205 | NM_173979 |

3.5 Padronização da PCR em Tempo-Real

Para a padronização da PCR em Tempo-Real, antes da quantificação, foram testadas três quantidades de cDNA (50, 100 e 200 ng) e três quantidades de *primer* (100, 200 e 400 nM) para cada gene, de forma a identificar a melhor eficiência para cada reação. O cDNA utilizado foi obtido a partir de blastocistos provenientes das raças Gir e Holandês produzidos *in vivo* de acordo com a metodologia descrita neste trabalho. Para obter uma maior homogeneidade no resultado da padronização, o cDNA das duas raças foi misturado e utilizado como uma única amostra. Cada conjunto de amostra (diluição de cDNA x diluição de *primer*) foi feita em duplicata em placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seladas com filme adesivo óptico (Applied Biosystems) e amplificadas no aparelho *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems). Para a reação de amplificação foi realizada utilizando o kit comercial *SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante.

As condições de amplificação variaram de acordo com as temperaturas de ligação para cada *primer* específico (Tabela 3). Para os sistemas que utilizavam *primer* com temperatura de ligação de 52°C a condição de amplificação foi: 95°C durante 10 minutos para ativação da *Taq* polimerase; 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos; e ligação a 52°C durante 30 segundos e extensão a 60°C durante 30 segundos. Para os sistemas que utilizavam *primer* com a temperatura de 60°C a condição de amplificação foi a seguinte: 95°C durante 10 minutos para ativação da *Taq* polimerase; 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos; e ligação e extensão a 60°C durante 60 segundos. Ao final dos 40 ciclos de amplificação, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, no intuito de verificar a presença ou ausência de produtos não específicos e/ou dímeros de *primer*. As amostras foram aquecidas com incremento de 1°C durante 30 segundos, partindo de 60°C até atingir o limite de 95°C.

A eficiência de cada reação foi calculada utilizando o *software* LinRegPCR[®] (RAMAKERS *et al.*, 2003). Em resumo, os valores logarítmicos de fluorescência em cada ciclo foram utilizados para obtenção da inclinação da reta, calculada a partir de

regressão linear simples, e para o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. Na curva padrão obtida para cada reação, somente os pontos com coeficiente de correlação entre 0,999 e 1 foram utilizados para o cálculo da eficiência. Desta forma foi possível obter a eficiência de cada reação individualmente. O valor de inclinação da reta foi empregado na fórmula: $Eff = 10^{[-1/\text{ângulo}]}$, onde $Eff = 1$ indicou ausência de transcrição e $Eff = 2$ indicou transcrição máxima ou eficiência máxima.

3.6 Quantificação relativa do cDNA das amostras experimentais por PCR em Tempo-Real

As quantificações relativas do cDNA das amostras de embriões *Gir-in vivo*, *Gir-in vitro*, *Holandês-in vivo* e *Holandês-in vitro* foram realizadas utilizando a metodologia de PCR em Tempo-Real. As reações foram feitas utilizando-se o kit comercial *SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade de cDNA e a concentração de *primer* utilizados foram os que demonstraram maior eficiência no processo de padronização das reações de acordo com a metodologia descrita no item 3.5.

De forma breve, a reação contendo cDNA, par de *primers*, Master Mix (dNTPs, referência passiva, *SYBR[®] Green*, etc) e 0,1 U Taq DNA Polimerase, em um volume final de 25 μ L, foi incubada a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, ligação na temperatura específica para cada primer por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Controles negativos nos quais o cDNA foi omitido durante a reação de PCR em Tempo-Real foram preparados. As amostras foram então incubadas no aparelho *ABI PRISM[®] 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems). Cada amostra (*Gir-in vivo*; *Gir-in vitro*; *Holandês-in vivo*; *Holandês-in vitro*) das respectivas repetições, foram avaliadas em triplicata em placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems), seladas com filme adesivo óptico (Applied Biosystems) e amplificadas no aparelho *ABI PRISM[®] 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems). Ao final dos ciclos de amplificação, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação seguindo o mesmo método descrito no

item 3.5, sendo aquecidas com incremento de 1°C durante 30 segundos, partindo de 60°C até atingir o limite de 95°C.

A quantificação foi realizada usando-se o método do C_T (*cycle threshold*) comparativo, com os resultados expressos relativos a genes de referência endógena e um grupo controle. O C_T corresponde ao ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*threshold*), servindo como base para comparação entre as amostras. O *threshold* pode ser automático, ou seja, determinado pelo próprio aparelho, ou estabelecido pelo usuário, sendo posicionado na região de amplificação exponencial ou geométrica das curvas de amplificação onde a eficiência da PCR é maior, e serve como uma referência do ponto no qual todas as amostras possuem uma mesma intensidade de fluorescência, ou seja uma mesma quantidade de produto da PCR.

Como a quantificação relativa se baseia na frequência relativa dos transcritos do gene alvo em relação a um gene de expressão constitutiva. Neste experimento os genes de referência endógena foram H2a, GAPDH e Beta-actina, pois têm fornecido bons resultados por apresentar pouca variação nos níveis de mRNA durante o desenvolvimento de blastocistos bovinos (LONERGAN *et al.*, 2003 b; NEMCOVA *et al.*, 2006; WARZYCH *et al.*, 2007). O grupo controle foi formado pelos embriões que foram produzidos *in vivo* quando a comparação foi entre sistemas de produção ou embriões da raça Gir quando a comparação foi entre raças, sendo a expressão mostrada como N vezes o controle. Os valores de expressão relativa são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM).

3.7 Análise dos resultados

A análise para quantificação relativa da expressão dos genes AQP1, AQP3, AQP11, Na/K-ATPase- α 1, Na/K-ATPase- β 2, PRDX1 e BAX foi realizada de acordo com o método descrito por Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002) que utiliza o seguinte modelo matemático:

$$\text{Expressão Relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta C_{t_{\text{alvo}}}}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta C_{t_{\text{Ref}}}}}$$

(Ct do controle – Ct da amostra)

(Ct do controle – Ct da amostra)

Onde:

E_{alvo} = Eficiência da PCR dos genes alvo.

Ct do Controle = Cycle threshold do grupo controle.

Ct da Amostra = Cycle threshold do grupo teste.

E_{Ref} = Eficiência da PCR do gene controle endógeno.

A partir deste método foi desenvolvido o *software* REST[®] (PFAFFL, HORGAN e DEMPFLÉ, 2002), que foi utilizado neste trabalho. O modelo estatístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST*[®] presente no *software* REST[®] foi utilizado para comparar as expressões diferenciais. Este modelo foi desenvolvido com base em testes de permutação, que são uma alternativa a ser utilizada quando os testes paramétricos não podem ser usados. Estes testes obtêm resultados a partir de permutações aleatórias dos dados do experimento. De forma sucinta, uma estatística de teste, baseada na probabilidade de um efeito ser maior do que o observado na hipótese nula (H_0) de ausência de efeito de um tratamento, que no caso deste trabalho seriam raça e sistema de produção, é calculada para os dados experimentais. Então os dados de Ct são permutados (ou rearranjados) repetidamente e a estatística de teste é calculada para cada uma das permutações resultantes. Como o número de permutações necessárias para a realização do teste aumenta à medida que o tamanho da amostra cresce, impossibilitando a obtenção de todas elas, serão consideradas pelo menos 2.000 permutações, que é o número recomendado por Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002) para obtenção de uma estimativa satisfatória do valor de significância (p).

Após a avaliação da expressão relativa, os produtos amplificados por PCR em Tempo-Real para todos os genes em cada grupo de embriões foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida a 8% (Anexo D), utilizando uma voltagem constante de 300v por um período de ~1h e 30 min, e corado com solução de nitrato de prata para observação dos fragmentos correspondentes aos transcritos amplificados e confirmação da especificidade da reação (ausência de amplificações inespecíficas). Foram utilizados 12 μ l de amostra com 3 μ l de tampão de corrida. Para a identificação do peso molecular foi usado um marcador de 25 pares de base (pb).

4 RESULTADOS

4.1. Padronização da PCR em Tempo-Real

Não houve amplificação do gene AQP1 em nenhuma das combinações testadas (cDNA x primer) para a padronização da PCR em Tempo-Real.

A concentração ótima de *primer* encontrada para amplificação foi 400 nM para todos os demais genes. A quantidade ideal de cDNA e a temperatura de dissociação dos genes estão descritas na Tabela 5. Estas concentrações estão relacionadas com os valores de maior eficiência das reações para cada amostra calculadas pelo *software* LinRegPCR® (RAMAKERS *et al.*, 2003). Os valores de eficiência e coeficiente de correlação das reações que levaram a identificação da melhor condição da PCR em Tempo-Real para cada gene estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 5: Quantidade ideal de cDNA e temperatura de dissociação (TD) dos genes analisados para o estudo de expressão gênica em blastocistos bovinos no processo de padronização da PCR em Tempo-Real.

| Gene | cDNA (ng) | TD (°C) |
|------------------------|-----------|---------|
| AQP3 | 200 | 83,6°C |
| AQP11 | 100 | 75,7°C |
| PRDX1 | 100 | 79,7°C |
| Na/K-ATPase α 1 | 200 | 80,1°C |
| Na/K-ATPase β 2 | 200 | 80,1°C |
| BAX | 200 | 84,7°C |
| H2a | 100 | 79,5°C |
| GAPDH | 200 | 80,7°C |
| β -actina | 200 | 88,3°C |

Tabela 6: Eficiência da reação e coeficiente de correlação (r) para cada gene utilizado para o estudo de expressão gênica em embriões bovinos nas condições padronizadas da PCR em Tempo-Real.

| Gene | Eficiência | r |
|------------------------|------------|-------|
| AQP3 | 1,98 | 0,999 |
| AQP11 | 1,93 | 1 |
| PRDX1 | 1,93 | 1 |
| Na/K-ATPase α 1 | 1,97 | 1 |
| Na/K-ATPase β 2 | 1,82 | 1 |
| BAX | 1,55 | 1 |
| H2a | 1,85 | 1 |
| β -actina | 1,98 | 1 |
| GAPDH | 1,91 | 1 |

As análises das curvas de dissociação dos genes testados mostraram não haver picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos em todas as diluições, com exceção do gene Na/K-ATPase β 2 que apresentou alguma variação nas curvas de dissociação das reações com menores concentrações de *primer* e quantidades de cDNA onde os valores de eficiência foram baixos (eficiência de aproximadamente 1,75). A ausência destes picos é uma das condições para os estudos de expressão quando se utiliza o corante SYBER[®] Green, já que este se liga a qualquer dupla fita de DNA podendo levar a uma alteração nos valores de expressão, e com isso, a um erro de interpretação. As curvas de dissociação dos genes utilizados podem ser observadas nas Figuras 7 a 15.

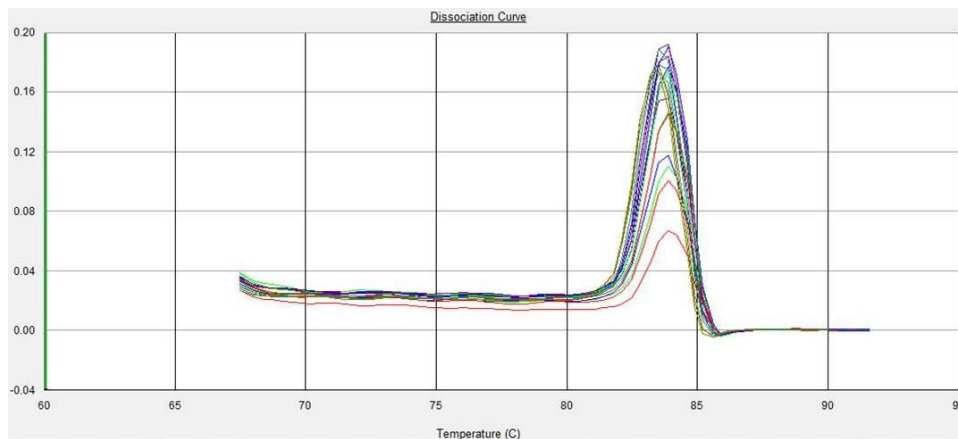


Figura 7: Curva de dissociação do gene AQP3 resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 83,6°C.

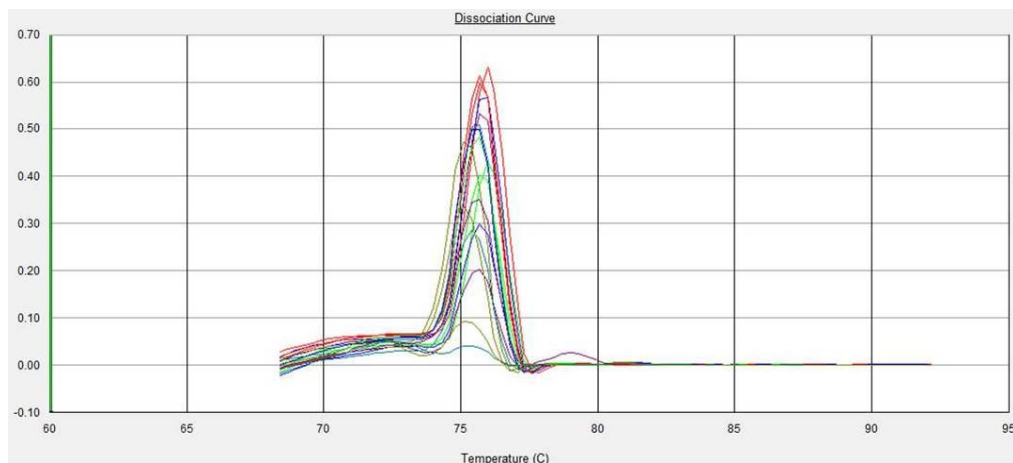


Figura 8: Curva de dissociação do gene AQP11 resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 75,7°C.

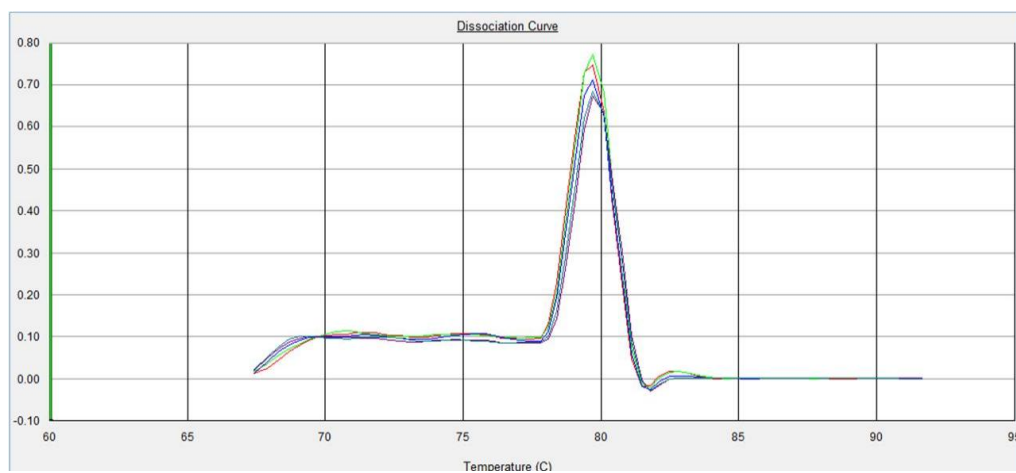


Figura 9: Curva de dissociação do gene PRDX1 resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 79,7°C.

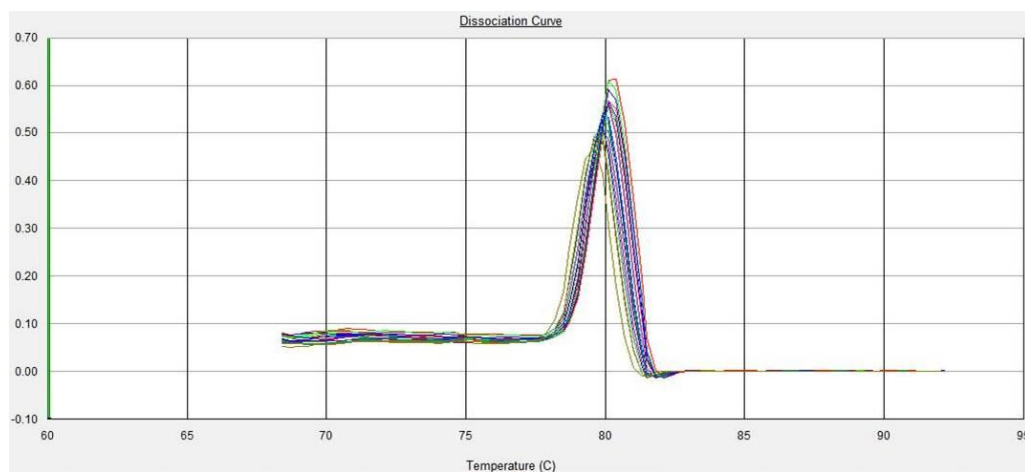


Figura 10: Curva de dissociação do gene Na/K-ATPase α 1 resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 80,1°C.

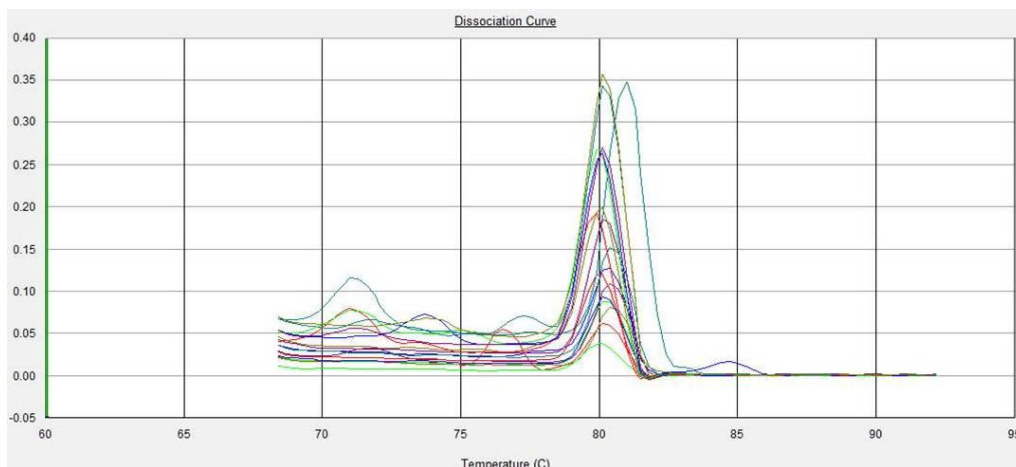


Figura 11: Curva de dissociação do gene Na/K-ATPase $\beta 2$ resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um ponto na temperatura de dissociação de 80,1°C e algumas variações em temperaturas menores.

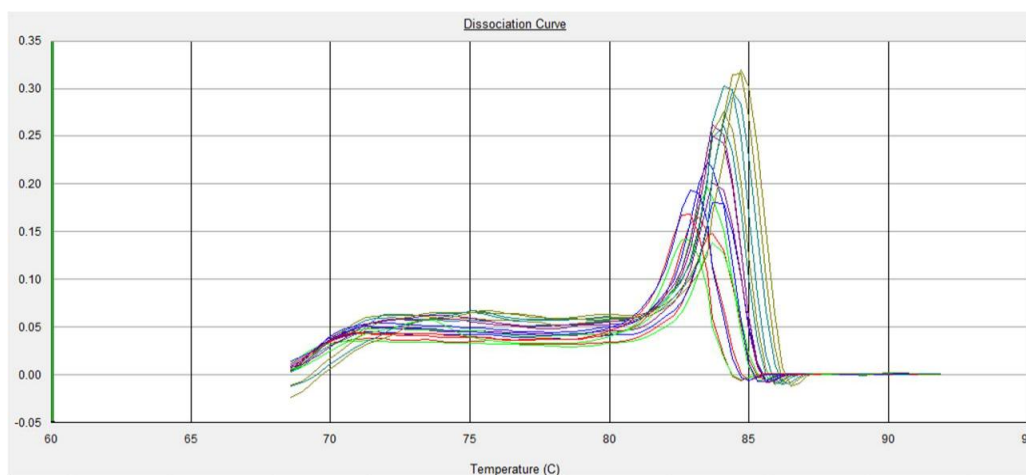


Figura 12: Curva de dissociação do gene BAX resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um ponto na temperatura de dissociação de 84,7°C.

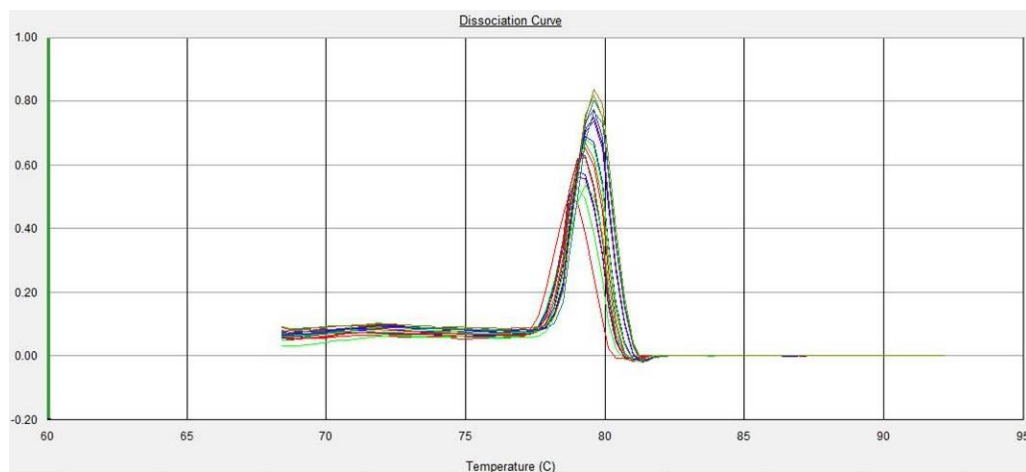


Figura 13: Curva de dissociação do gene H2a resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 79,5°C.

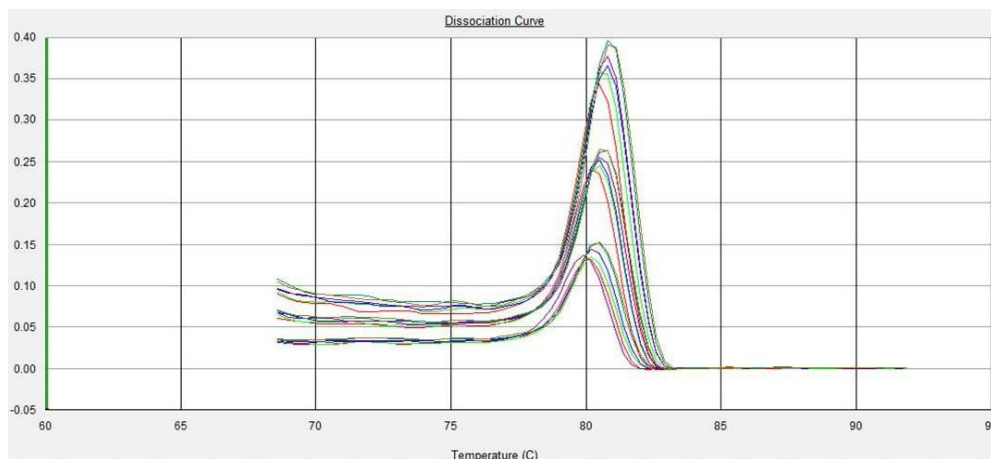


Figura 14: Curva de dissociação do gene GAPDH resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 80,7°C.

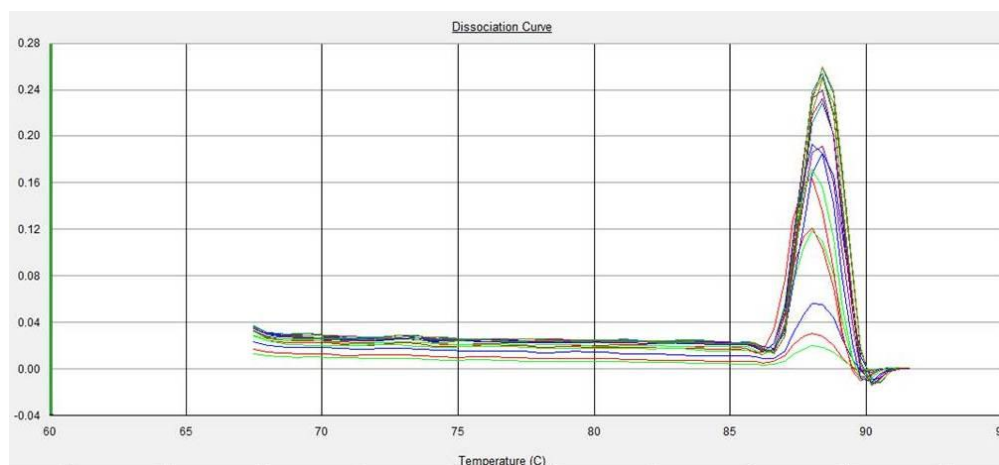


Figura 15: Curva de dissociação do gene β -actina resultante da padronização da PCR em Tempo-Real mostrando um único ponto na temperatura de dissociação de 88,3°C.

4.2 Quantificação do cDNA das amostras experimentais por PCR em Tempo-Real

O coeficiente de variação médio dos valores de C_t entre as triplicatas que não diferiram em mais de 1 ciclo, em cada repetição dos grupos considerados (Gir: *in vivo*; Gir: *in vitro*; Holandês: *in vivo*; Holandês: *in vitro*), não ultrapassou 5% (Tabela 7). As comparações no gene BAX foram realizadas com duas repetições para todos os grupos devido à falha e/ou presença de mais de um pico na curva de dissociação. Este fato ocorreu somente neste gene em uma repetição para todos os grupos aleatoriamente.

O controle endógeno selecionado para a normalização das amostras foi o gene H2a, uma vez que apresentou menor coeficiente de variação (CV) entre os valores de C_t de todas as amostras (5,06%) quando comparado com os genes GAPDH e β -actina.

Tabela 7: Média dos C_t s e coeficiente de variação (CV) por gene para cada um dos grupos de embriões avaliados no experimento de expressão gênica relativa em blastocistos bovinos.

| Gene | Repetição | Raça | C_t médio | | CV(%) | |
|-------------------------|-----------|----------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | | | <i>In vivo</i> | <i>In vitro</i> | <i>In vivo</i> | <i>In vitro</i> |
| AQP3 | 1 | Gir | 30,08 | 28,26 | 0,20 | 0,29 |
| | | Holandês | 31,17 | 29,36 | 1,59 | 0,58 |
| | 2 | Gir | 27,25 | 30,47 | 0,30 | 1,43 |
| | | Holandês | 29,33 | 33,34 | 0,18 | 0,42 |
| | 3 | Gir | 30,95 | 28,95 | 0,88 | 1,90 |
| | | Holandês | 27,29 | 28,53 | 3,29 | 0,32 |
| AQP11 | 1 | Gir | 36,76 | 35,90 | 1,17 | 1,75 |
| | | Holandês | 35,86 | 38,56 | 0,19 | 0,84 |
| | 2 | Gir | 36,80 | 35,64 | 0,96 | 1,71 |
| | | Holandês | 36,30 | 38,10 | 0,76 | 0,10 |
| | 3 | Gir | 38,75 | 37,22 | 1,35 | 1,81 |
| | | Holandês | 35,89 | 36,03 | 0,68 | 0,64 |
| PRDX1 | 1 | Gir | 28,40 | 28,70 | 0,52 | 0,92 |
| | | Holandês | 30,16 | 29,56 | 1,02 | 0,29 |
| | 2 | Gir | 28,20 | 28,83 | 0,25 | 0,16 |
| | | Holandês | 29,99 | 30,26 | 0,87 | 0,22 |
| | 3 | Gir | 31,40 | 31,37 | 0 | 0,45 |
| | | Holandês | 28,16 | 30,28 | 0,55 | 0,36 |
| Na/K-ATPase- α 1 | 1 | Gir | 28,96 | 27,38 | 0,19 | 1,03 |
| | | Holandês | 30,30 | 28,12 | 0,28 | 0,57 |
| | 2 | Gir | 26,75 | 29,54 | 1,29 | 0,14 |
| | | Holandês | 28,15 | 32,13 | 0,34 | 0,59 |
| | 3 | Gir | 31,02 | 28,89 | 0,81 | 0,07 |
| | | Holandês | 28,19 | 27,78 | 0,10 | 0,91 |
| Na/K-ATPase- β 2 | 1 | Gir | 40,65 | 37,76 | 0,17 | 1,13 |
| | | Holandês | 35,31 | 39,22 | 0 | 0,21 |
| | 2 | Gir | 35,64 | 41,07 | 4,30 | 0 |
| | | Holandês | 40,82 | 40,25 | 0,63 | 2,46 |
| | 3 | Gir | 39,35 | 40,29 | 0 | 0,08 |
| | | Holandês | 36,90 | 37,78 | 0,58 | 0,14 |
| BAX | 1 | Gir | 28,17 | 28,39 | 0,80 | 1,81 |
| | | Holandês | 27,52 | 27,61 | 0,37 | 1,02 |
| | 2 | Gir | 26,85 | Ø | 1,68 | Ø |
| | | Holandês | 27,60 | Ø | 1,15 | Ø |
| | 3 | Gir | Ø | 28,77 | Ø | 0,46 |
| | | Holandês | Ø | 27,58 | Ø | 1,54 |
| H2a | 1 | Gir | 29,38 | 28,27 | 0,23 | 0,40 |
| | | Holandês | 28,37 | 30,09 | 0,16 | 0,67 |
| | 2 | Gir | 29,13 | 26,60 | 0,46 | 0,49 |
| | | Holandês | 29,36 | 30,26 | 0,22 | 0,32 |
| | 3 | Gir | 32,40 | 30,91 | 0,27 | 0,38 |
| | | Holandês | 28,31 | 28,79 | 0,15 | 0,76 |

Ø, repetições que falharam e/ou apresentaram mais de um pico na curva de dissociação.

Para avaliar o efeito de raça e sistema de produção nos blastocistos foram conduzidas as seguintes comparações: I) Gir: *in vivo* x *in vitro*; II) Holandês: *in vivo* x *in vitro*; III) *In vivo*: Gir x Holandês; IV) *In vitro*: Gir x Holandês.

As eficiências médias das amplificações nas comparações propostas para cada gene avaliado utilizadas para a análise de expressão relativa foram calculadas pelo software LinRegPCR® (RAMAKERS *et al.*, 2003) utilizando os valores de eficiência para cada triplicata em todas as repetições consideradas em cada comparação do respectivo gene e estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8: Eficiência média das amplificações obtidas por PCR em Tempo-Real nas comparações entre os grupos de blastocistos bovinos para cada gene utilizada para a análise de expressão relativa.

| Comparação | Gene | Eficiência Média |
|---|-------------------------|------------------|
| Gir <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i> | AQP3 | 1,88 |
| | AQP11 | 1,74 |
| | PRDX1 | 1,85 |
| | Na/K-ATPase- α 1 | 1,83 |
| | Na/K-ATPase- β 2 | 1,59 |
| | BAX | 1,39 |
| | H2a | 1,78 |
| Holandês <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i> | AQP3 | 1,80 |
| | AQP11 | 1,72 |
| | PRDX1 | 1,83 |
| | Na/K-ATPase- α 1 | 1,73 |
| | Na/K-ATPase- β 2 | 1,65 |
| | BAX | 1,46 |
| | H2a | 1,81 |
| <i>In vivo</i> : Gir x Holandês | AQP3 | 1,76 |
| | AQP11 | 1,72 |
| | PRDX1 | 1,85 |
| | Na/K-ATPase- α 1 | 1,70 |
| | Na/K-ATPase- β 2 | 1,50 |
| | BAX | 1,44 |
| | H2a | 1,82 |
| <i>In vitro</i> : Gir x Holandês | AQP3 | 1,90 |
| | AQP11 | 1,75 |
| | PRDX1 | 1,84 |
| | Na/K-ATPase- α 1 | 1,86 |
| | Na/K-ATPase- β 2 | 1,76 |
| | BAX | 1,40 |
| | H2a | 1,78 |

Na avaliação do efeito do sistema de produção dentro da raça Gir, a expressão relativa de 50% dos genes avaliados (PRDX1; Na/K-ATPase- β 2 e BAX) apresentou-se sub-regulada ($p < 0,01$; $p < 0,05$), enquanto os genes AQP3, AQP11 e Na/K-ATPase- α 1 não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nas amostras de embriões produzidos *in vitro* quando comparados com embriões *in vivo* (Figura 16).

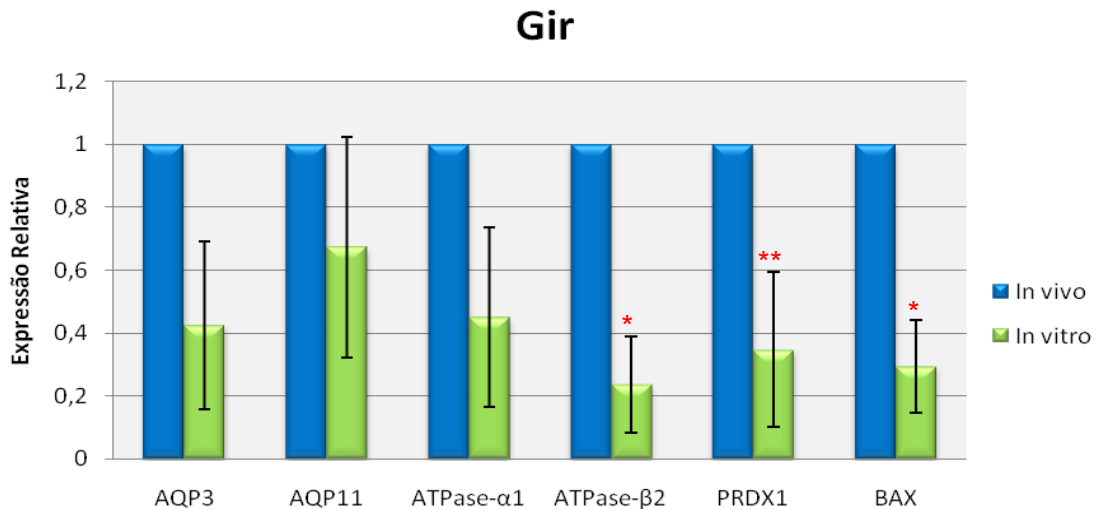


Figura 16: Expressão relativa (média \pm EPM) dos genes AQP3, AQP11, Na/K-ATPase- α 1, Na/K-ATPase- β 2, PRDX1 e BAX em embriões produzidos *in vitro* comparados com embriões produzidos *in vivo* na raça Gir (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

Na raça Holandesa, a expressão relativa de 16,6% dos genes avaliados (BAX) apresentou-se sobre-regulada ($p < 0,01$), enquanto 83,3% dos genes (AQP3, AQP11, Na/K-ATPase- α 1, Na/K-ATPase- β 2 e PRDX1) não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nas amostras de embriões produzidos *in vitro* quando comparados com embriões *in vivo* (Figura 17).

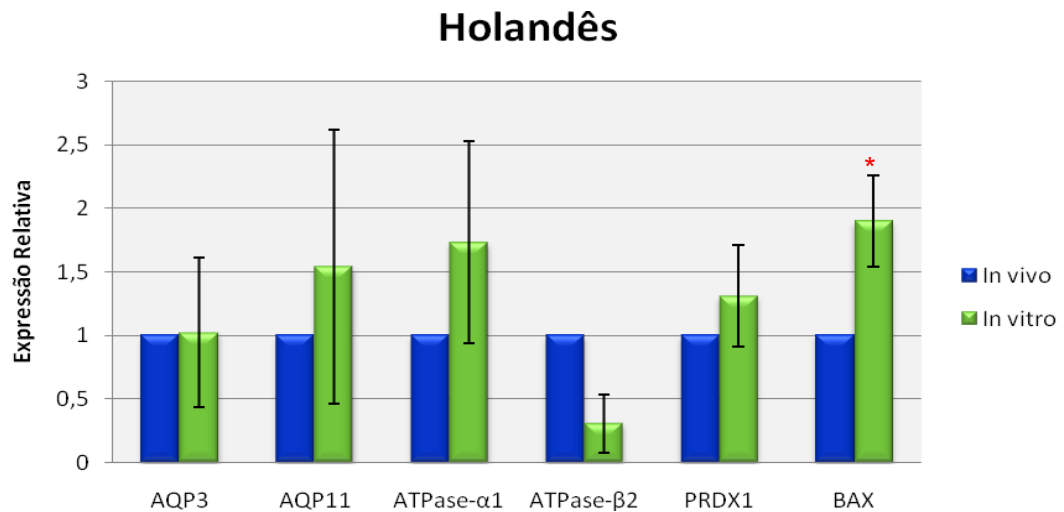


Figura 17: Expressão relativa (média±EPM) dos genes AQP3, AQP11, Na/K-ATPase- α 1, Na/K-ATPase- β 2, PRDX1 e BAX em embriões produzidos *in vitro* comparados com embriões produzidos *in vivo* na raça Holandesa (*, $p < 0,01$).

Quando as raças foram comparadas dentro do sistema de produção *in vivo*, os embriões da raça Holandesa apresentaram 66,6% dos genes avaliados (AQP3, Na/K-ATPase- α 1, PRDX1, e BAX) sub-regulados ($p < 0,05$), enquanto 33,3% dos genes (Na/K-ATPase- β 2 e AQP11) não demonstraram diferenças significativas na expressão ($p > 0,05$) em relação aos embriões da raça Gir (Figura 18).

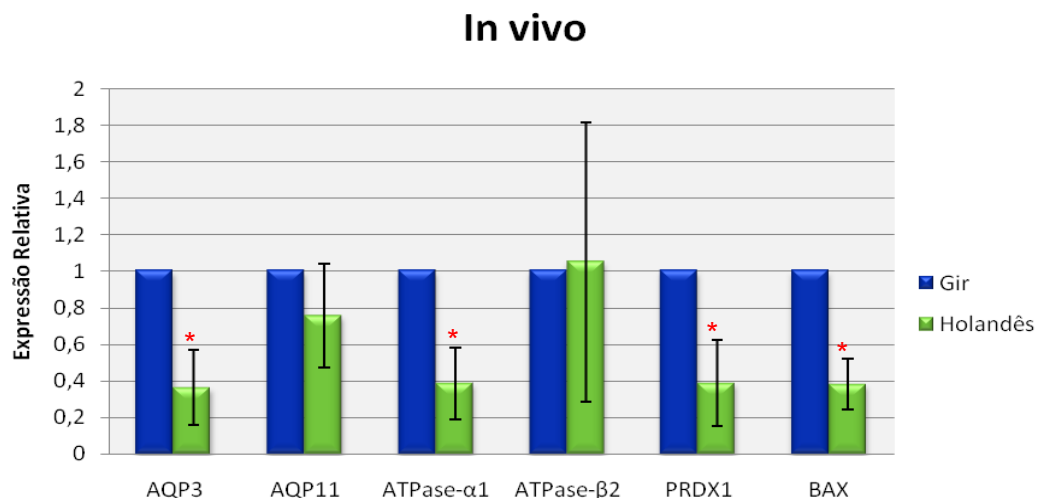


Figura 18: Expressão relativa (média±EPM) dos genes AQP3, AQP11, Na/K-ATPase- α 1, Na/K-ATPase- β 2, PRDX1 e BAX em embriões produzidos *in vivo* da raça Holandesa comparados com os produzidos *in vivo* da raça Gir (*, $p < 0,05$).

Para a produção *in vitro*, os embriões da raça Holandesa apresentaram a expressão relativa de 16,6% dos genes avaliados (BAX) apresentou-se sobre-regulada ($p < 0,05$), enquanto 83,3% dos genes (AQP3, AQP11, Na/K-ATPase- α 1, Na/K-ATPase- β 2 e PRDX1) não apresentaram diferenças significativas na expressão ($p > 0,05$) quando comparados com os embriões da raça Gir (Figura 19).

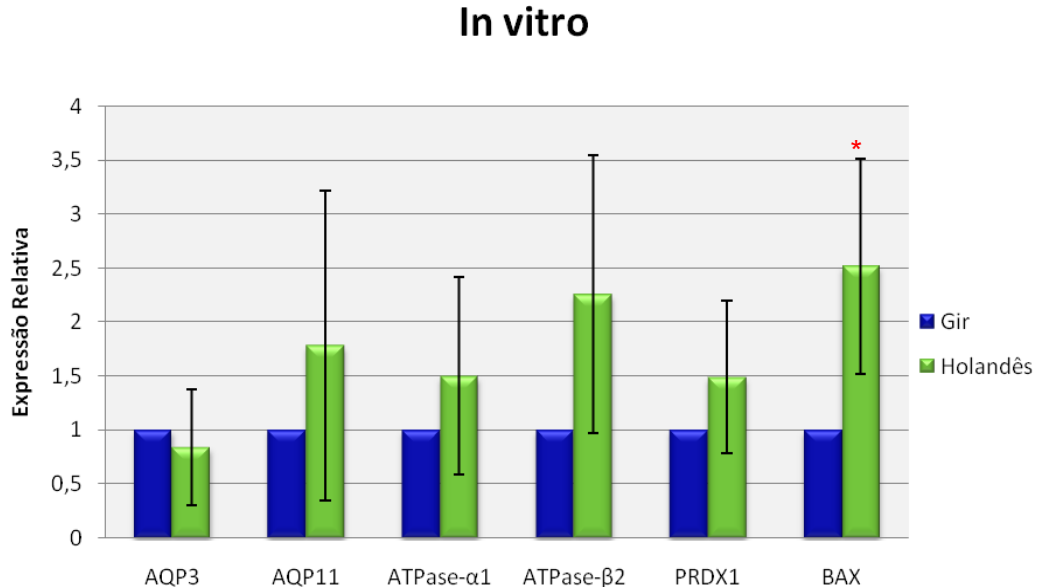


Figura 19: Expressão relativa (média \pm EPM) dos genes AQP3, AQP11, Na/K-ATPase- α 1, Na/K-ATPase- β 2, PRDX1 e BAX em embriões produzidos *in vitro* da raça Holandesa comparados com os produzidos *in vitro* da raça Gir (*, $p < 0,05$).

Após a amplificação das reações por PCR em Tempo-Real as amostras resultantes foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida (8%) para a observação dos fragmentos correspondentes aos transcritos amplificados. Na figura 20, para o gene AQP3, é possível observar a presença de um fragmento no controle negativo devido ao vazamento do poço anterior, porém na curva de dissociação a amostra do controle negativo não apresentou crescimento, demonstrando a ausência de produto amplificado. Os demais fragmentos apresentam tamanho esperado de 136 pares de base e a curva de dissociação das amostras está apresentada na Figura 21.

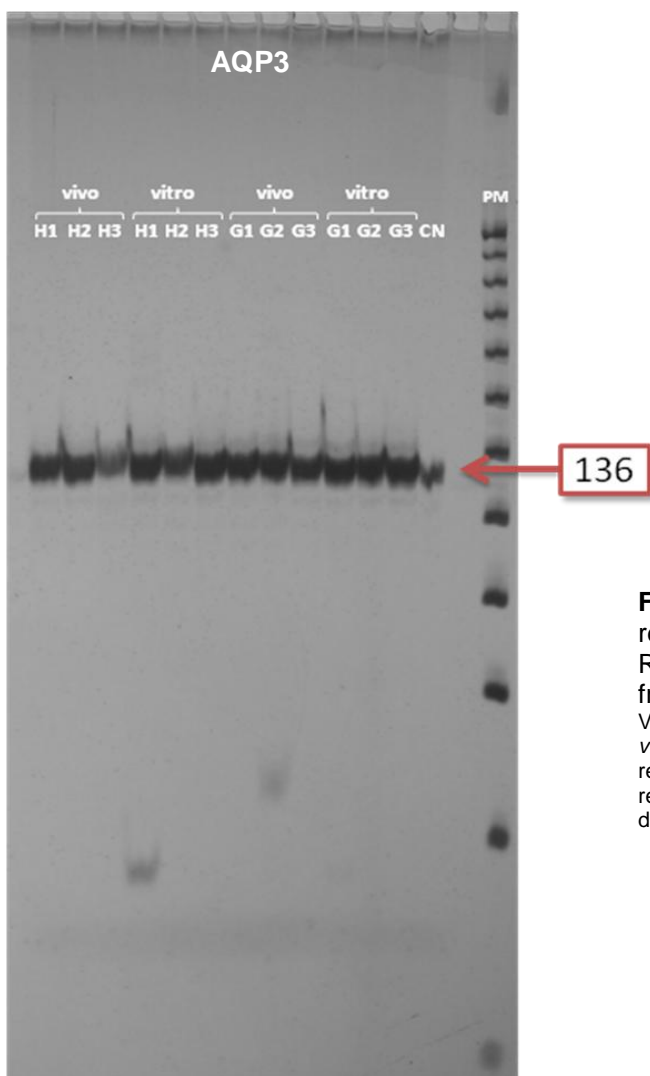


Figura 20: Gel de acrilamida (8%) das amostras resultantes da amplificação por PCR em Tempo-Real para o transcrito do gene AQP3 com o fragmento esperado de 136 pares de base.

Vivo, embriões produzidos *in vivo*; Vitro, embriões produzidos *in vitro*; H1, H2 e H3, repetições 1, 2 e 3 da raça Holandesa, respectivamente; G1, G2 e G3, repetições 1, 2 e 3 da raça Gir, respectivamente; PM, marcador de peso molecular de 25 pares de base; CN, controle negativo.

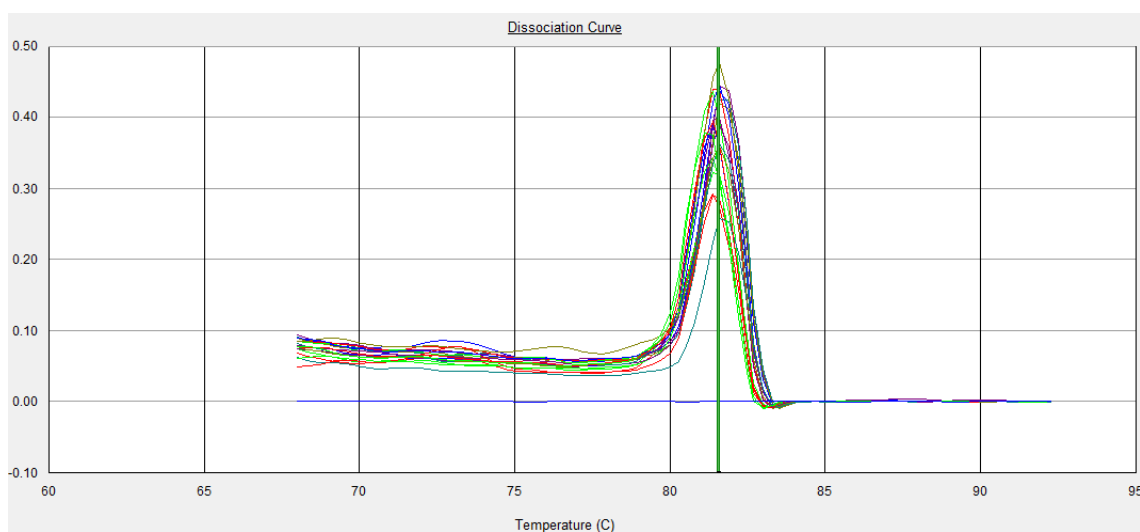


Figura 21: Curva de dissociação na temperatura de 81,6°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene AQP3 nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos.

Para os genes H2a e Na/K-ATPase $\alpha 1$ a Figura 22 apresenta os tamanhos de fragmentos esperados de 176 e 129 pares de base, respectivamente. Nas curvas de dissociação da PCR em Tempo-Real também não foram observadas amplificações inespecíficas (Figuras 23 e 24, respectivamente).

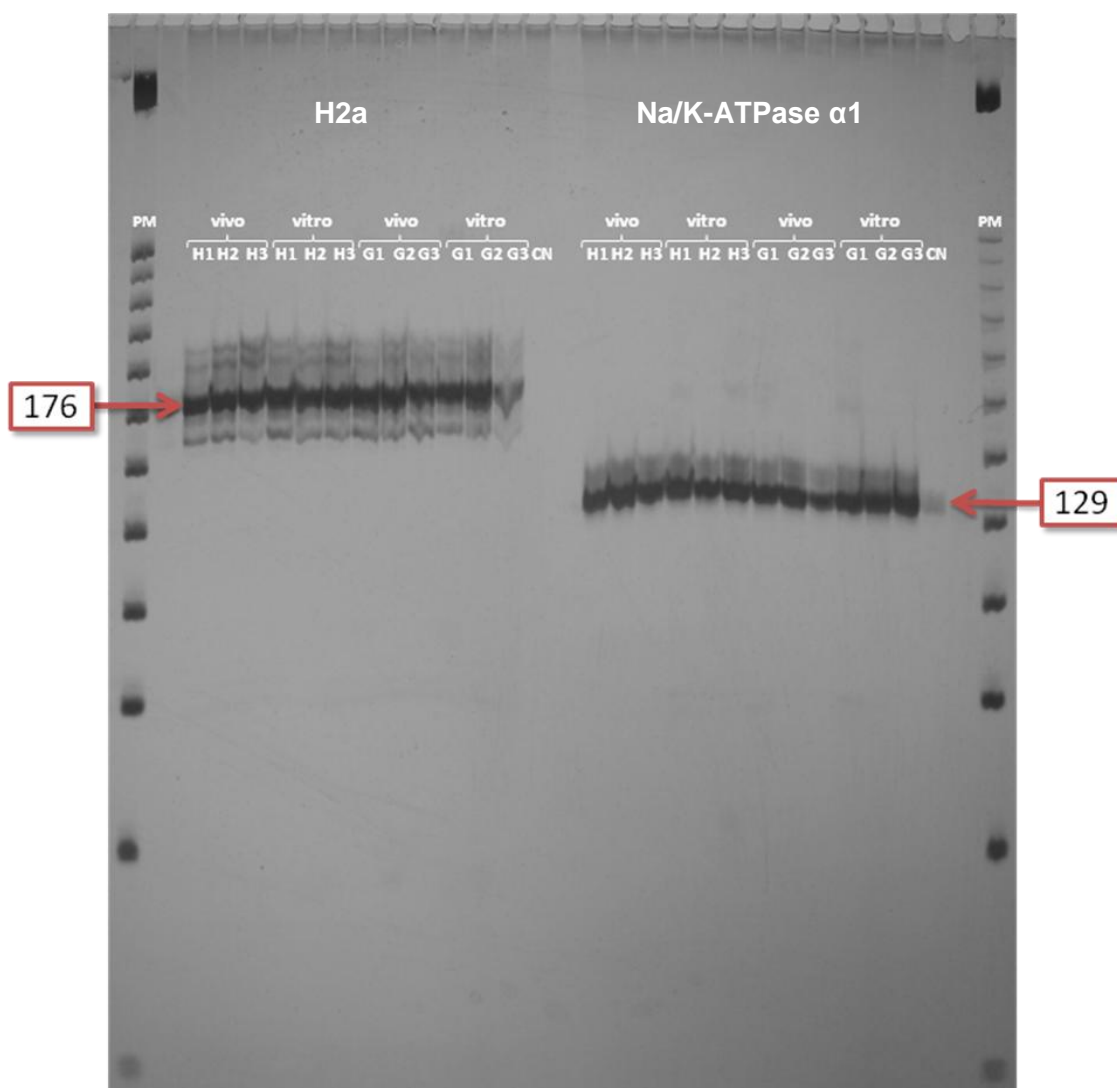


Figura 22: Gel de acrilamida (8%) das amostras resultantes da amplificação por PCR em Tempo-Real para os transcritos dos genes H2a e Na/K-ATPase $\alpha 1$ com os fragmentos esperados de 176 e 129 pares de base, respectivamente.

Vivo, embriões produzidos *in vivo*; Vitro, embriões produzidos *in vitro*; H1, H2 e H3, repetições 1, 2 e 3 da raça Holandesa, respectivamente; G1, G2 e G3, repetições 1, 2 e 3 da raça Gir, respectivamente; PM, marcador de peso molecular de 25 pares de base; CN, controle negativo.

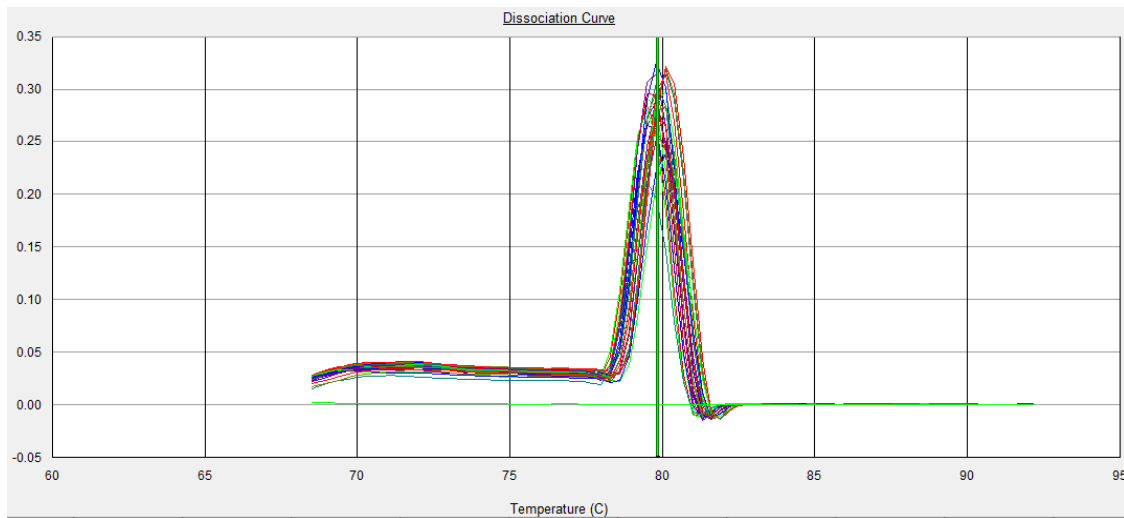


Figura 23: Curva de dissociação na temperatura de 79,9°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene H2a nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos.

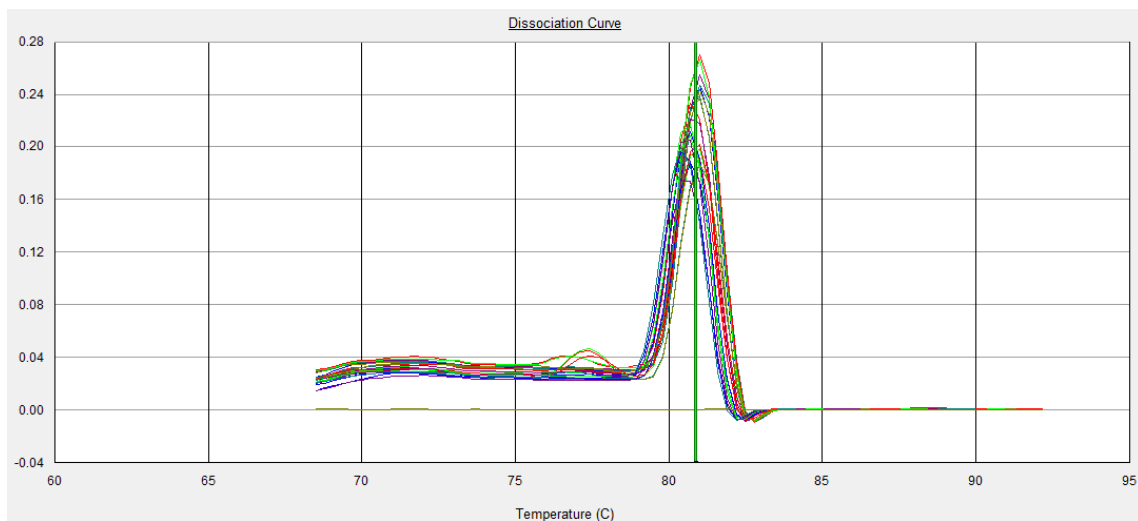


Figura 24: Curva de dissociação na temperatura de 80,9°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene Na/K-ATPase $\alpha 1$ nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos.

Para o gene Na/K-ATPase $\beta 2$, não foi observada nenhuma amplificação inespecífica, nem na eletroforese (Figura 25), nem na curva de dissociação da PCR em Tempo-Real (Figura 26). O fragmento observado apresentava o tamanho esperado de 116 pares de base. No gene AQP11 foi possível observar um pequeno fragmento na repetição 2 (G2) do grupo Gir *in vitro* (Figura 25) sugerindo a presença de dímeros de *primer*, porém tal observação não se confirmou na curva de dissociação (Figura 27). Os fragmentos observados apresentaram o tamanho esperado de 208 pares de base.

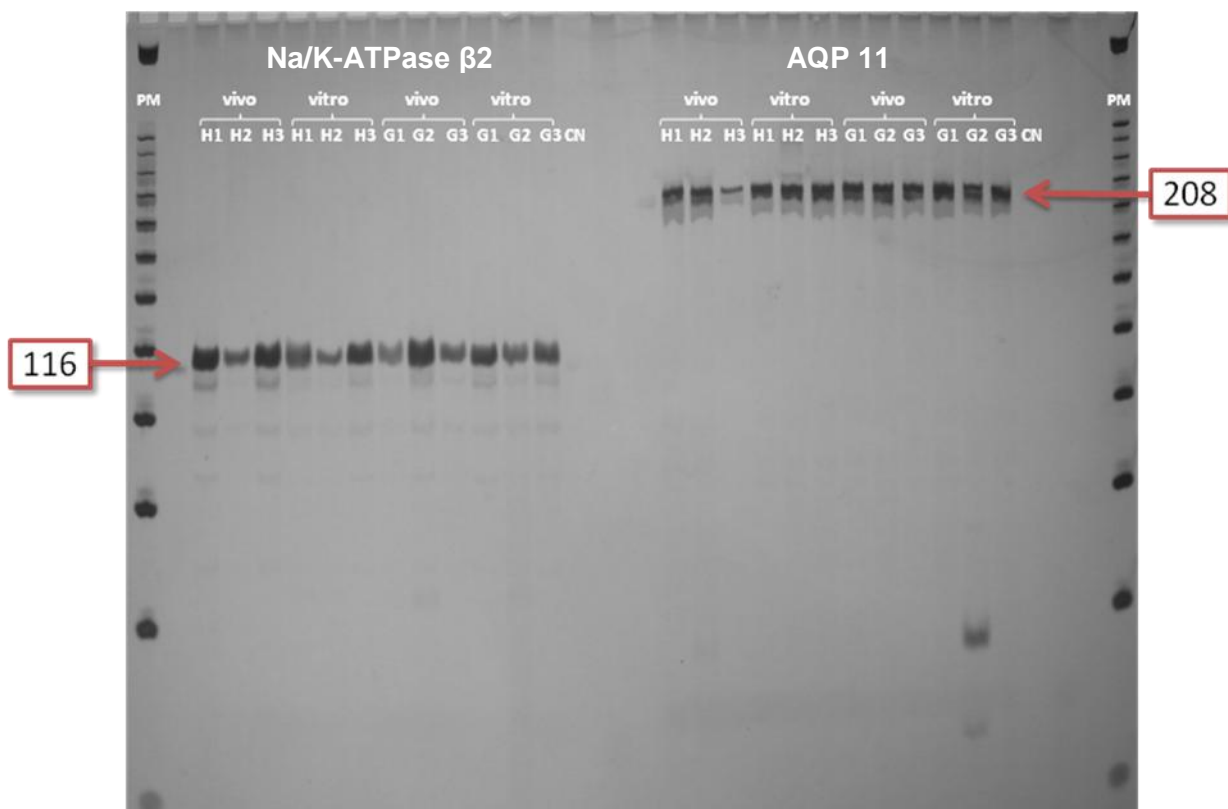


Figura 25: Gel de acrilamida (8%) das amostras resultantes da amplificação por PCR em Tempo-Real para os transcritos dos genes Na/K-ATPase $\beta 2$ e AQP11 com os fragmentos esperados de 116 e 208 pares de base, respectivamente.

Vivo, embriões produzidos *in vivo*; Vitro, embriões produzidos *in vitro*; H1, H2 e H3, repetições 1, 2 e 3 da raça Holandesa, respectivamente; G1, G2 e G3, repetições 1, 2 e 3 da raça Gir, respectivamente; PM, marcador de peso molecular de 25 pares de base; CN, controle negativo.

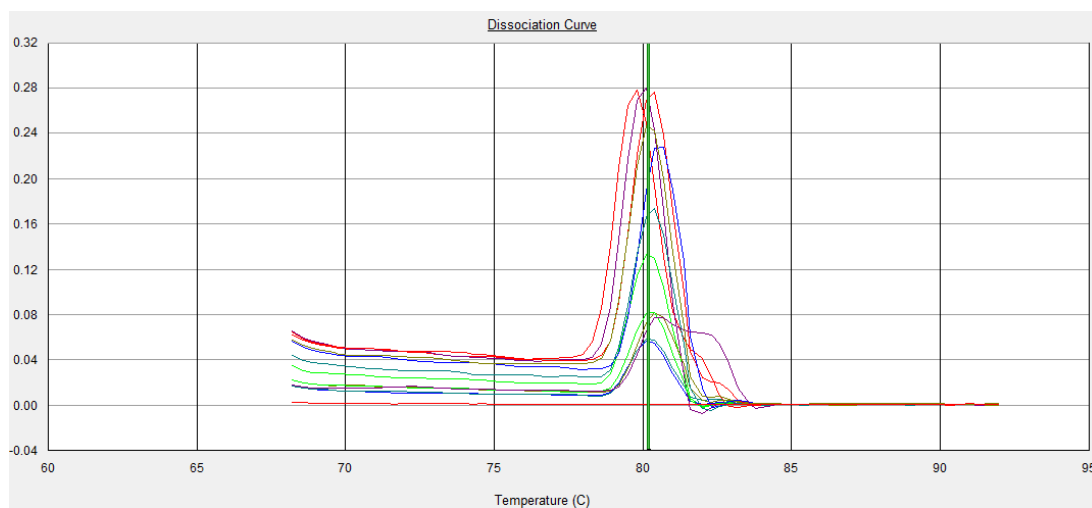


Figura 26: Curva de dissociação na temperatura de 80,2°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene Na/K-ATPase $\beta 2$ nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos.

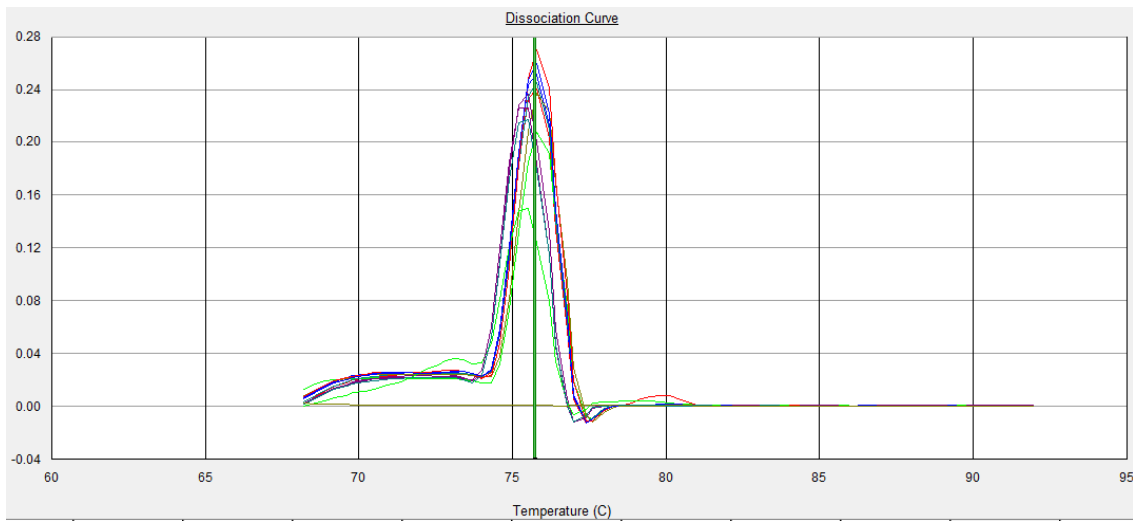


Figura 27: Curva de dissociação na temperatura de 75,7°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene AQP11 nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos.

A eletroforese dos fragmentos amplificados referentes ao gene PRDX1 demonstrou uma amplificação inespecífica de aproximadamente 70 pares de base além dos fragmentos esperados de 224 pares de base em 8 das 12 amostras apresentadas (Figura 28). A curva de dissociação da PCR em Tempo-Real (Figura 29) apresentou apenas um pico de dissociação, o que sugere a ausência de produtos inespecíficos de tamanhos diferentes de 224 pares de base. Portanto, não foi possível observar uma deformação na curva que possa explicar a presença de tais fragmentos, pois com este tamanho a temperatura de dissociação seria menor que a observada para os fragmentos do transcrito do gene PRDX1.

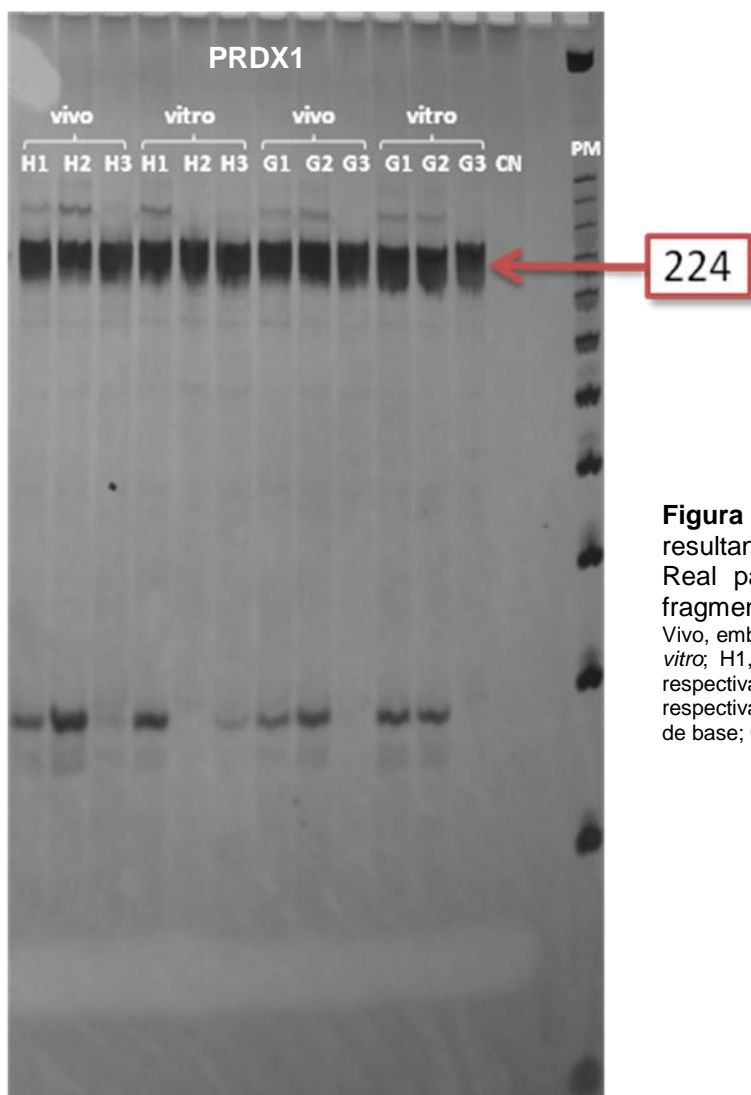


Figura 28: Gel de acrilamida (8%) das amostras resultantes da amplificação por PCR em Tempo-Real para o transcrito do gene PRDX1 com o fragmento esperado de 224 pares de base.

Vivo, embriões produzidos *in vivo*; Vitro, embriões produzidos *in vitro*; H1, H2 e H3, repetições 1, 2 e 3 da raça Holandesa, respectivamente; G1, G2 e G3, repetições 1, 2 e 3 da raça Gir, respectivamente; PM, marcador de peso molecular de 25 pares de base; CN, controle negativo.

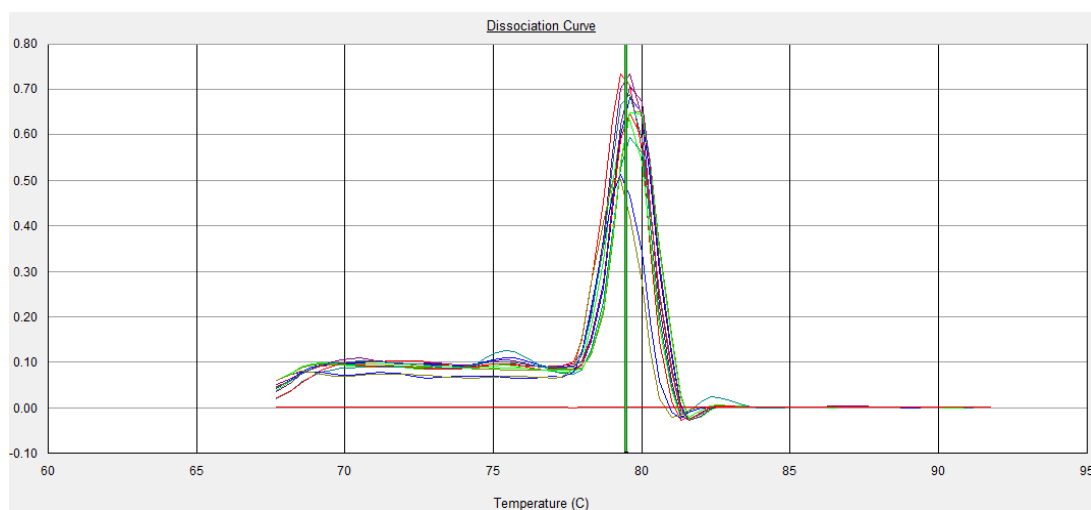


Figura 29: Curva de dissociação na temperatura de 79,4°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene PRDX1 nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos.

A eletroforese para os fragmentos do transcrito do gene BAX apresentaram o tamanho esperado de 174 pares de base (Figura 30). Na curva de dissociação da PCR em Tempo-Real ocorreu apenas um pico demonstrando assim a ausência de amplificação inespecífica (Figura 31).

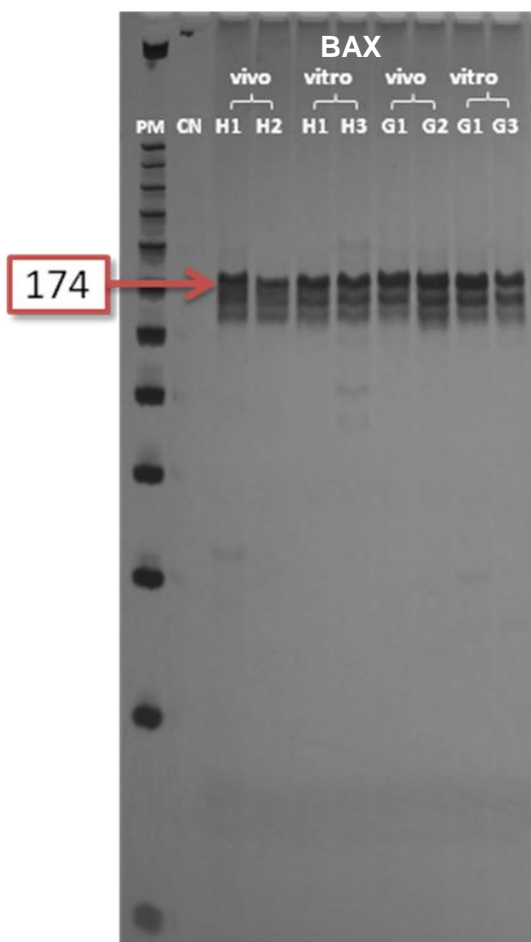


Figura 30: Gel de acrilamida (8%) das amostras resultantes da amplificação por PCR em Tempo-Real para o transcrito do gene BAX com o fragmento esperado de 174 pares de base.

Vivo, embriões produzidos *in vivo*; Vitro, embriões produzidos *in vitro*; H1, H2 e H3, repetições 1, 2 e 3 da raça Holandesa, respectivamente; G1, G2 e G3, repetições 1, 2 e 3 da raça Gir, respectivamente; PM, marcador de peso molecular de 25 pares de base; CN, controle negativo.

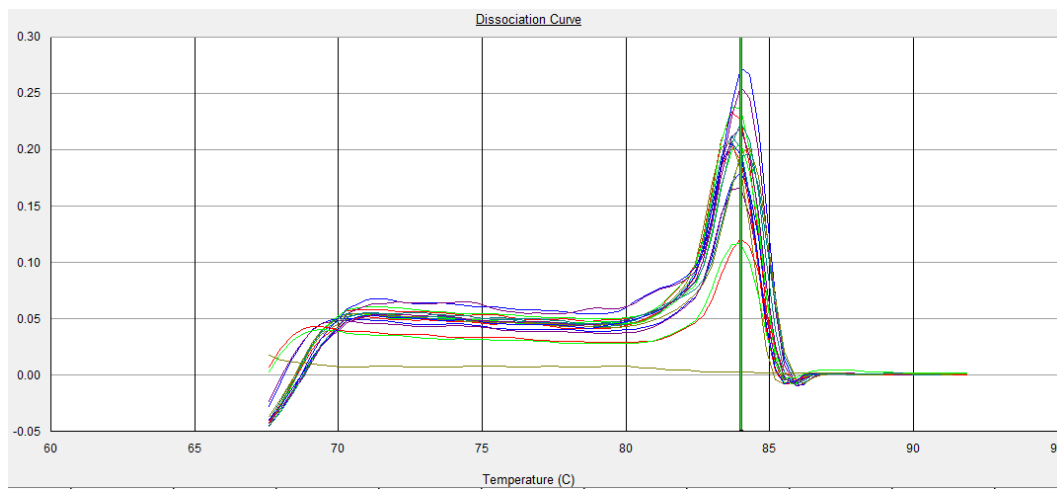


Figura 31: Curva de dissociação na temperatura de 84°C das amostras amplificadas por PCR em Tempo-Real para os transcritos do gene BAX nas triplicatas das amostras de todos os grupos de blastocistos bovinos.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, levando-se em consideração a sensibilidade do método e a ausência de amplificação na PCR em Tempo-Real, foi possível confirmar a hipótese da ausência de expressão do gene AQP1 no estágio de blastocisto em bovinos. Em um estudo prévio Wohlres-Viana *et al.* (2007), identificaram a presença do transcrito de AQP1 em amostras de rins utilizadas como controle, porém nas amostras de blastocistos bovinos este transcrito não foi identificado. Este resultado pode sugerir que a passagem de água por estes canais pode não estar envolvida no desenvolvimento e sobrevivência embrionária durante este estágio. Neste caso, outros estudos são necessários para definir o momento a partir do qual este gene passa a ser transcrito.

Em embriões de camundongos, Offenber *et al.* (2000) identificaram transcritos do gene AQP1 em blastocistos. Entretanto, em um trabalho posterior (OFFENBERG e THOMSEN, 2005), utilizando o mesmo conjunto de *primers*, mas uma linhagem diferente de camundongos, este transcrito não foi identificado, sugerindo que existe uma diferença de expressão deste gene nas linhagens utilizadas. Em uma terceira linhagem de camundongos, Edashige, Sakamoto e Kasai (2000) não identificaram transcritos de AQP1 em nenhum estágio de desenvolvimento embrionário (quatro células, mórula e blastocisto). Em todos os trabalhos citados os controles utilizados (tecido renal) apresentaram transcritos deste gene.

Na comparação *in vivo* x *in vitro* para a raça Gir (Figura 16), os transcritos para os genes Na/K-ATPase β 2, PRDX1 e BAX apresentaram-se em maior quantidade nos blastocistos produzidos *in vitro* quando comparados com as estruturas produzidas *in vivo*. Na mesma comparação para a raça Holandesa (Figura 17), apenas os transcritos para o gene BAX encontravam-se em menor quantidade nos blastocistos produzidos *in vitro* quando comparados com produzidos *in vivo*.

A redução na expressão do gene Na/K-ATPase β 2, observada nos blastocistos da raça Gir produzidos *in vitro*, poderia levar a um mal-funcionamento da bomba de sódio e potássio, uma vez que esta subunidade é necessária para o funcionamento normal da enzima, além de atuar como chaperona para estabilizar o dobramento

correto da subunidade α (revisado por BLANCO e MERCER, 1998), resultando em alterações na formação da blastocelule.

Além disso, a menor quantidade de transcritos do gene PRDX1 sugere que estes embriões podem ter seu estoque de mRNA reduzidos por uma demanda associada com o estresse oxidativo presente no ambiente de cultivo, porém sem uma adequada reposição pela transcrição do gene, tornando os embriões mais susceptíveis ao cultivo *in vitro*.

Para os transcritos do gene BAX, os resultados indicam que o sistema de produção *in vitro* interfere na quantidade de transcritos para este gene em blastocistos de ambas as raças, porém de maneira oposta. Enquanto reduz a expressão deste gene em embriões Gir, o sistema de produção *in vitro* estimula a expressão nos embriões da raça Holandesa, ambos comparados com embriões produzidos *in vivo*. Este comportamento oposto de expressão pode também ser observado quando se compara as raças dentro de um sistema de produção. Enquanto embriões Gir produzidos *in vivo* apresentam uma sobre-regulação para o gene BAX (Fig. 18) em relação aos embriões produzidos *in vivo* da raça Holandesa, os produzidos *in vitro* apresentam uma sub-regulação (Fig. 19).

Estes resultados podem indicar que os embriões taurinos produzidos *in vitro* estejam mais sujeitos a apresentar morte celular programada devido à maior expressão de transcritos pró-apoptóticos (BAX). Segundo Camargo *et al.* (2007), no sistema de PIVE utilizando oócitos coletados em ambiente tropical, os embriões zebuínos tendem a atingir maiores taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto do que embriões taurinos, o que poderia estar relacionado a uma maior susceptibilidade à apoptose nos embriões taurinos. Esta suposição é consistente com os resultados obtidos no estudo de Gjørret *et al.* (2003), onde blastocistos taurinos produzidos *in vitro* apresentaram um maior número de núcleos e características apoptóticas, resultantes da cascata de eventos da morte celular programada, do que os blastocistos produzidos *in vivo*. Estes dados também podem ser correlacionados com os observados por Rizos *et al.* (2002), onde blastocistos taurinos produzidos *in vitro* apresentaram mRNA do gene BAX mais expresso do que os produzidos *in vivo*. O mesmo resultado foi obtido por Lonergan *et*

al. (2003b) em embriões no estágio de 8-16 células produzidos *in vitro* quando comparados com equivalentes produzidos *in vivo*.

Contudo, deve-se levar em consideração que o papel do BAX na apoptose depende da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como a BCL-2, de proteases (caspases), e de proteínas chaperonas (HSPs – *Heat shock proteins*) (BEERE, 2004; JOHNSON, 2003; ZIMMERMANN, BONZON e GREEN, 2001). Por outro lado, a maior quantidade de transcritos do gene BAX em embriões Gir produzidos *in vivo* em relação aos produzidos *in vitro* é intrigante, uma vez que não se espera um maior índice de células apoptóticas nesses embriões quando comparados com os produzidos *in vitro*. É possível que, apesar da expressão elevada, a ação dos produtos do gene BAX estejam sendo regulados pela expressão do gene BCL-2 ou HSP, ambos com ação anti-apoptótica. Novos estudos devem ser conduzidos na tentativa de se elucidar o papel dessa menor expressão do gene BAX e sua relação com outros genes em embriões produzidos *in vitro* a partir de animais zebuínos.

A ausência de variação na expressão do gene Na/K-ATPase $\alpha 1$ e AQP3 é um resultado que difere do encontrado por Camargo *et al.* (2005b), onde estes transcritos apresentaram-se sobre-regulados em blastocistos taurinos produzidos *in vivo* quando comparados com os produzidos *in vitro*. Tais diferenças podem ser devidas aos sistemas de cultivo em que os embriões foram produzidos *in vitro* e que podem influenciar na expressão dos genes, uma vez que os embriões do presente estudo foram produzidos sob condições de elevada tensão de O₂, na presença de soro e de células somáticas no cultivo, diferentes das utilizadas por Camargo *et al.* (2005b).

Na comparação das raças Gir x Holandesa para o sistema de produção *in vivo* (Figura 18), os transcritos dos genes AQP3, Na/K-ATPase $\alpha 1$, PRDX1, e BAX apresentaram-se sub-regulados nos grupos de blastocistos da raça Holandesa quando comparados com as estruturas da raça Gir. Estes resultados sugerem a existência de diferentes padrões de expressão gênica associados às raças, uma vez que o sistema de produção *in vivo* é o ambiente de desenvolvimento natural destes embriões.

A sub-regulação dos transcritos para o gene AQP3 e para Na/K-ATPase $\alpha 1$ nos grupos de embriões taurinos quando comparados com embriões zebuínos, ambos produzidos *in vivo* (Figura 18), pode ter implicações na formação do blastocisto, que

envolve o estabelecimento de um gradiente de osmótico através do trofoderma mediado por Na/K-ATPases que bombeiam água através dos canais de água (aquaporinas) (WATSON, NATALE e BARCROFT, 2004). Este resultado pode indicar diferenças entre raças na capacidade de gerar o gradiente osmótico nos embriões, que por sua vez é responsável pelo acúmulo de líquido no interior da cavidade do blastocisto e pode estar relacionado com alterações na expansão da blastocele e/ou na re-expansão após um desafio osmótico, como ocorre na criopreservação. Além disso, esta sub-regulação dos transcritos de AQP3 e Na/K-ATPase $\alpha 1$ nos grupos de blastocistos da raça Holandesa sugere que embriões taurinos e zebuínos podem possuir diferenças nos mecanismos de cavitação, como por exemplo, o momento de expansão da blastocele.

A maior quantidade de transcritos para o gene PRDX1 em embriões da raça Gir produzidos *in vivo* em relação aos embriões da raça Holandesa (Figura 18) pode sugerir uma maior capacidade desses embriões de progenitores da raça Gir em manter prontamente disponível quantidades mais elevadas de transcritos para uma situação de estresse, reduzindo um provável efeito deletério do ambiente natural.

A sub-regulação dos genes AQP3 e Na/K-ATPase $\alpha 1$ (envolvidos no processo de cavitação) e dos genes PRDX1 e BAX (relacionados a apoptose e estresse oxidativo, respectivamente) nos grupos de embriões produzidos *in vivo* da raça Holandesa quando comparados com embriões da raça Gir (Figura 18), sugere que existem diferenças relacionadas ao aspecto molecular que podem ter surgido devido a adaptações para a sobrevivência embrionária nas diferentes condições existentes no ambiente de origem destas raças.

As alterações observadas entre os embriões das raças Gir e Holandesa no sistema de produção *in vivo* não se repetiram entre os embriões produzidos *in vitro* das duas raças (Figura 19), com exceção dos transcritos para o gene BAX. Estes resultados sugerem que embriões produzidos *in vivo* de raças diferentes podem possuir mecanismos diferenciados na regulação da expressão ou degradação de transcritos deste gene e isto pode estar associado à capacidade dos embriões dessas raças em sobreviver em ambientes estressantes. Contudo, no ambiente *in vitro* o padrão de expressão de cinco dos seis genes avaliados foi o mesmo entre as raças, indicando

que para o embrião sobreviver em um ambiente de cultivo *in vitro*, as diferenças de expressão entre as raças devem ser amenizadas, direcionando para um mesmo padrão de expressão. Desta forma, pode-se sugerir uma atenuação das diferenças observadas para estes genes nos embriões produzidos *in vivo* pelo sistema de produção *in vitro*.

Algumas evidências mostram que as diferenças entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* envolvem aspectos morfológicos e moleculares. Provavelmente tais diferenças são induzidas por fatores como qualidade do oócito, ambiente folicular, fecundação e ambiente de cultivo embrionário. Embriões produzidos *in vitro* geralmente apresentam uma coloração mais escura, formação precoce da blastocela sem a compactação apropriada, e menor número de células do que os embriões produzidos *in vivo*, alterações na frequência de apoptose, na tolerância à criopreservação, e na expressão gênica e metabolismo celular (CAMARGO *et al.*, 2006; KNIJN *et al.*, 2002; LONERGAN *et al.*, 2006). Os resultados do presente trabalho mostram que a raça também é um fator que deve ser levado em consideração quando se avalia diferenças entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, pois diferenças moleculares podem ser ressaltadas ou minimizadas, como observado para os genes Na/K-ATPase β 2, PRDX e BAX para as raças Gir e Holandesa.

De maneira geral, foi possível observar alterações significativas em pelo menos um transcrito para todas as comparações realizadas. Diversos outros genes estão envolvidos na regulação e manutenção do desenvolvimento embrionário normal. Porém, como a quantidade de transcritos é limitada, apenas poucos genes podem ser avaliados por experimento. Para confirmar os resultados obtidos seriam necessários outros estudos que incluíssem a imunodeteção das proteínas, taxas de sobrevivência pós-criopreservação e taxas de gestação, tornando possível o confronto com os dados das alterações nos padrões de expressão gênica.

Em resumo, observou-se que existem diferenças entre raças quanto a expressão de determinados genes nos embriões em estágio de pre-implantação, o que pode ser devido a uma adaptação desses animais aos diferentes ambientes naturais em sua origem evolutiva. Contudo, ambientes de cultivo *in vitro* parecem direcionar a expressão de genes para um mesmo padrão nesses embriões, minimizando diferenças entre as raças. De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a comparar o padrão de

expressão de genes entre embriões *Bos taurus* e *Bos indicus* de aptidão leiteira, produzidos *in vitro* ou *in vivo*. A identificação de diferenças de expressão entre embriões de raças diferentes e informações sobre como seus embriões se comportam em um ambiente *in vitro* podem ser utilizadas para o estabelecimento de procedimentos de cultivo que favoreçam a manutenção de diferenças fisiológicas, tornando os embriões produzidos *in vitro* mais similares aos produzidos *in vivo* de cada raça.

6 CONCLUSÕES

A análise da expressão gênica em embriões é uma ferramenta importante para estudar diferenças condicionadas pela raça ou induzidas pelo ambiente. No presente estudo, concluiu-se que:

- 1) Existem diferenças entre as raças utilizadas (Gir e Holandesa) para a expressão dos genes associados a transporte transmembrana, cavitação, estresse e apoptose observadas na comparação dos embriões produzidos *in vivo*;
- 2) O sistema de produção *in vitro* influencia a expressão gênica, fazendo com que as diferenças entre as raças observadas na comparação dos embriões produzidos no sistema *in vivo*, sejam atenuadas pelo processo de cultivo *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K.; BRETON, J.; DRAPIER, J-C. 2008. The interplay between nitric oxide and peroxiredoxins. **Immunobiology**, **213**: 815-822.

BARCROFT, L. C.; MOSELEY, A. E.; LINGREL, J. B.; WATSON, A. J. 2004. Deletion of the Na/K-ATPase α 1-subunit gene (*Atp1a1*) does not prevent cavitation of the preimplantation mouse embryo. **Mechanisms of Development**, **121**: 417- 426.

BARCROFT, L. C.; OFFENBERG, H.; THOMSEN, P.; WATSON, A. J. 2003. Aquaporin proteins in murine trophoctodermmediate transepithelial water movements during cavitation. **Developmental Biology**, **256**: 342-354.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. 2007. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, **31(2)**: 205-211.

BARUSELLI, P. S.; AS FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F.; BARROS, C. M.; BO, G. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, **65**: 77-88.

BEERE, H. M. 2004. "The stress of dying": the role of the heat shock proteins in the regulation of apoptosis. **Journal of Cell Science**, **117**: 2641-2651.

BETTS, D. H.; BARCROFT, L. C.; WATSON, A. J. 1998. Na/K-ATPase-Mediated $^{86}\text{Rb}^+$ uptake and asymmetrical trophoctoderm localization of α 1 and α 3 Na/K-ATPase isoforms during bovine preattachment development. **Developmental Biology**, **197**: 77-92.

BETTS, D. H.; MACPHEE, D. J.; KIDDER, G. M.; WATSON, A. J. 1997. Ouabain sensitivity and expression of Na/K-ATPase alpha- and beta-subunit isoforms genes during bovine early development. **Molecular Reproduction and Development**, **46(2)**: 114-126.

BLANCO, G.; MERCER, R. W. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, **275**: 633-650.

BUDD, D. C.; SPRAGG, E. J.; RIDD, K.; TOBIN, A. B. 2004. Signalling of the M3-muscarinic receptor to the anti-apoptotic pathway. **Biochemistry Journal**, **381**: 43–49.

CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; VALE FILHO, V. R. 2005 (a). Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Reproduction Science**, **85**: 53-59.

CAMARGO, L. S. A.; POWELL, A. M.; do VALE FILHO, V. R.; WALL, R. J. 2005 (b). Comparison of gene expression in individual preimplantation bovine embryos produced by *in vitro* fertilization or somatic cell nuclear transfer. **Reproduction, Fertility and Development**, **17**: 487-496.

CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; RAMOS, A. A.; VALE FILHO, V. R. 2006. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, **3 (1)**: 19-28.

CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; RAMOS, A. A.; SERAPIÃO, R. V.; de SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; GUIMARÃES, M. F. M.; do VALE FILHO, V. R. 2007. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, **68**: 626-632.

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos Taurus*, and *Bos Taurus* heifers. **Theriogenology**, **69**: 167-175.

CHAE, H. Z.; CHUNG, S. J.; RHEE, S. G. 1994. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. **Journal of Biological Chemistry**, **269**: 27670-27678.

DOBRINSKY, J. R. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, **57**: 285-302.

EDASHIGE, K.; SAKAMOTO, M.; KASAI, M. 2000. Expression of mRNAs of the aquaporin family in mouse oocytes and embryos. **Cryobiology**, **40**: 171-175.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T. E.; WEBSTER, G. E. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, **72(1)**:68-78.

ERICKSON, G. F. 1997. Defining apoptosis: players and systems. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation, 4 (5):** 219-228.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology, 47:** 1489-1505.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X. ; BERGFELT, D. R. 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science, 78:** 239-257.

GJØRRET, J. O.; KNIJN, H. M.; DIELEMAN, S. J.; AVERY, B.; LARSSON, L. I.; MADDOX-HYTTEL, P. 2003. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. **Biology of Reproduction, 69:** 1193-1200.

GJØRRET, J. O.; FABIAN, D.; AVERY, B.; MADDOX-HYTTEL, P. 2007. Active caspase-3 and ultrastructural evidence of apoptosis in spontaneous and induced cell death in bovine in vitro produced pre-implantation embryos. **Molecular Reproduction and Development, 74:** 961-971.

GOOSSENS, K.; VAN SOOM, A.; VAN POUCKE, M.; VANDAELE, L.; VANDESOMPELE, J.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L. J. 2007. Identification and expression analysis of genes associated with bovine blastocyst formation. **BMC Developmental Biology, 7 (64).**

Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-213/7/64>>

GORDON, I. 2003. **Laboratory production of cattle embryos.** CAB International. London: Cambridge University Press, p. 640.

GORDON, I. 2004. **Reproductive technologies in farm animals.** CAB International. London: Cambridge University Press, p. 151.

GORELICK, D. A.; PRAETORIUS, J.; TSUNENARI, T.; NIELSEN, S.; AGRE, P. 2006. Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. **BMC Biochemistry, 7 (14).**

Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/14>>

GUÉRIN, P.; EI MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update, 7 (2):** 175-189.

IMAI, K.; TAGAWA, M.; YOSHIOKA, H.; MATOBA, S.; NARITA, M.; INABA, Y.; AIKAWA, Y.; OHTAKE, M.; KOBAYASHI, S. 2006. The efficiency of embryo production by ovum pick-up and *in vitro* fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Development, 52, suppl.**

ITOH, T.; RAI, T.; KUWAHARA, M.; KO, S. B. H.; UCHIDA, S.; SASAKI, S.; ISHIBASHI, K. 2005. Identification of a novel aquaporins, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications, 330:** 832-838.

JOHNSON, A. L. 2003. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Animal Reproduction Science, 78:** 185-201.

KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. M.; ZEINSTRA, E. C.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; NIEMANN, H.; DIELEMAN, S. J. 2005. *In vitro* and *in vivo* effects on mRNA expression of genes involved in metabolism and apoptosis in bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development, 17:** 775–784.

KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. M.; HERRMANN, D.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; NIEMANN, H.; DIELEMAN, S. J. 2002. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. **Reproduction, 124:** 365–375.

LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. 2002. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction, 67:** 767-775.

LEYENS, G.; DONNAY, I.; KNOOPS, B. 2003. Cloning of bovine peroxiredoxins: Gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse, and primate peroxiredoxins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 136:** 943-955.

LEYENS, G.; KNOOPS, B.; DONNAY, I. 2004. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, **69**: 243-25.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. 2003 (a). Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, **38**: 259-267.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; MOREIRA, P. M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P. 2003 (b). Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, **69**: 1424-1431.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. O. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, **65**: 137-152.

LONERGAN, P.; FAIR, T. 2008. *In vitro*-produced bovine embryos – Dealing with the warts. **Theriogenology**, **69 (1)**: 17-22.

MACPHEE, D.J.; JONES, D.H.; BARR, K.J.; BETTS, D.H.; WATSON, A.J.; KIDDER, G.M. 2000. Differential involvement of Na⁺,K⁺-ATPase isozymes in preimplantation development of the mouse. **Developmental Biology**, **222**: 486-498.

MADAN, P.; ROSE, K.; WATSON, A. J. 2007. Na/K-ATPase β 1 subunit expression is required for blastocyst formation and normal assembly of trophectoderm tight junction-associated proteins. **Journal of Biological Chemistry**, **282 (16)**: 12127-12134.

MESSAGEAMPTMII a RNA Amplification Kit. 2006. Austin, Texas: Ambion Inc., 36 p. Manual Instruction.

MEUWISSEN, T. H. 1998. Optimizing pure line breeding strategies utilizing reproductive technologies. **Journal of Dairy Science**, **81 (Suppl 2)**: 47-54.

MORISHITA, Y.; MATSUZAKI, T.; HARA-CHIKUMA, M.; ANDOO, A.; SHIMONO, M.; MATSUKI, A.; KOBAYASHI, K.; IKEDA, M.; YAMAMOTO, T.; VERKMAN, A.; KUSANO, E.; OOKAWARA, S.; TAKATA, K.; SASAKI, S.; ISHIBASHI, K. 2005. Disruption of

aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. **Molecular and Cellular Biology**, **25**: 7770-7779.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M. A. 2006. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, **73**: 1376-1379.

NASSER, L. F.; REZENDE, L. F.; BÓ, G. A.; BARTH, A. 2008. Induction of parturition in Zebu-cross recipients carrying *in vitro*-produced *Bos indicus* embryos. **Theriogenology**, **69**: 116-123.

NEMCOVA, L.; MACHATKOVA, M.; HANZALOVA, K.; HORAKOVA, J.; KANKA, J. 2006. Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular developmental stage. **Theriogenology**, **65**: 1254–1264.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, **53**: 21-34.

OFFENBERG, H.; BARCROFT, L. C.; CAVENEY, A.; VIUFF, D.; THOMSEN, P. D.; WATSON, A. J. 2000. mRNAs encoding aquaporins are present during murine preimplantation development. **Molecular Reproduction and Development**, **57**: 323-330.

OFFENBERG, H.; THOMSEN, P. D. 2005. Functional challenge affects aquaporin mRNA abundance in mouse blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, **v.71**: 422-430.

OKADA, S.; MISAKA, T.; TANAKA, Y.; MATSUMOTO, I.; ISHIBASHI, K.; SASAKI, S.; ABE, K. 2008. Aquaporin-11 knockout mice and polycystic kidney disease animals share a common mechanism of cyst formation. **The FASEB Journal**, **22**: 3672-3684.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, **30 (9)**, e36.

RAMAKERS, C; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, **339**: 62–66.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; ARROYO-GARCIA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIERREZ-ADAN, A. 2002. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, **66**: 589-595.

RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; DE'ATH, G. 1995. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, **104 (1)**: 41-49.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ, p.365-386.
Disponível em: <<http://primer3.sourceforge.net/>>

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. 2005. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, **63**: 2382-2394.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. 1998. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3.ed. Savoy IL: IETS, p.83-88.

TAKATA, K.; MATSUZAKI, T.; TAJIKA, Y. 2004. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, **39**: 1-83.

THIBIER, M. 2008. International Embryo Transfer Society: Data Retrieval Committee Annual Report. **Embryo Transfer Newsletter**, **26 (4)**: 4-9.

USHIZAWA, K.; HERATH, C. B.; KANEYAMA, K.; SHIOJIMA, S.; HIRASAWA, A.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; OCHIAI, K.; TOKUNAGA, T.; TSUNODA, Y.; TSUJIMOTO, G.; HASHIZUME, K. 2004. cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. **Reproductive Biology and Endocrinology**, **2 (77)**.

Disponível em: <<http://www.rbej.com/content/2/1/77>>

VAJTA, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, **60-61**: 357-364.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. 2006. Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. **Theriogenology**, **65**: 914-925.

VARAGO, F. C.; SALIBA, W. P.; ALVIM, M. T. T.; VASCONCELOS, A. B.; OLIVEIRA, C. H.; STAHLBERG, R.; LAGARES, M. A. 2006. Vitrification of *in vitro* produced Zebu embryos. **Animal Reproduction**, **3 (3)**: 353-358.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SA, W. F.; FERNANDES C. A. C.; JUNIOR, A. P. M. 2004. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, **84 (1-2)**: 1-12.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. 2007. Bovine embryo production in Brazil: a new scenario. **Acta Scientiae Veterinariae**, **35 (suppl. 3)**: s920-s924.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. 2000. Follicular dynamics in Zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **35 (12)**: 2501-2509.

VISINTIN, J. A.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; MIZUTA, K.; CELEGHINI, E. C. C.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; GUSMÕES, P. P. G.; CANDINI, P. H. 1999. Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelação de embriões pelo método *one-step* com etilenoglicol. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, **36 (5)**

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-95961999000500009&script=sci_arttext>

WARZYCH, E.; WRENZYCKI, C.; PEIPPO, J.; LECHNIAK, D. 2007. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, **74**: 280-289.

WATSON, A. J.; NATALE, D. R.; BARCROFT, L. C. 2004. Molecular regulation of blastocyst formation. **Animal Reproduction Science**, **82-83**: 583-592.

WILKINSON, R. F.; MING, R.; ANDERSON, B.; BUNCH, T. D.; WHITE, K. L. 1996. The use of neural networks in developing novel embryo culture media-formulations. **Theriogenology**, **45**: 41-49.

WOHLRES-VIANA, S.; BOITÉ, M. C.; PEREIRA, M. M.; BATISTA, R. I. T. P.; MOTA, G. B.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S.; MACHADO, M. A. 2007. Identificação de transcritos da família Aquaporina em embriões bovinos.. In: XXX Semana de Biologia, XIII Mostra de Produção Científica.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSAWE, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. 2005. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reproduction, Fertility and Development**, **17**: 23-25.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. 2007. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, **68S**: S77-S83.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. 2001. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, **92**: 57-70.

ANEXOS
(protocolos)

ANEXO A

EXTRAÇÃO DE RNA (RNEASY MICRO KIT – QIAGEN)

Pontos importantes:

- O tampão RLT pode precipitar quando estocado. Se necessário redissolver aquecendo, e então deixar a temperatura ambiente.
- O tampão RLT e RW1 contêm sal de guanidina e, portanto não são compatíveis com agentes desinfetantes contendo água sanitária (não adicionar, altamente reativo). Tomar cuidado e utilizar luvas.
- Todos os passos do protocolo, incluindo a centrifugação, devem ser realizados a temperatura ambiente. Durante o procedimento trabalhar rápido.

Antes de começar:

- Ao utilizar o kit pela primeira vez, preparar o etanol 80%, misturando 24 mL de etanol (96-100%) e 6 mL de água RNase-free (presente no kit).
- Adicionar 10 µl β-Mercaptoetanol (β-ME) a 1 mL do tampão RLT (após a adição é estável por um mês a temperatura ambiente). Tubo 1,5 mL.
- Adicionar 4 volumes de etanol (96-100%) como indicado no frasco do tampão RPE.
- Preparar a solução estoque de DNase 1 utilizando DNase livre de RNase pela primeira vez. Dissolver a DNase 1 sólida em Água RNase-free (550 µl). Tomar cuidado para não perder DNase 1 quando abrir o vial. Misturar gentilmente invertendo o tubo. **Não vortexar!**
- Adicionar 5 µl de poly-A dissolvido em 34 µl de RLT (tubo 0,2 mL) misturando por pipetagem. Utilizar 6 µl desta mistura para misturar com 54 µl de RLT (tubo 0,2 mL). A concentração final é de 4 ng/µl. Utilizar 5 µl por amostra.

Procedimento:

- Lisar as células pela adição de 350 µl de RLT (c/ β-ME) no criotubo. Vortexar ou pipetar por +/- 1 min para homogeneizar.
- quando processar um número > 5000 células, adicionar 20 ng de RNA carreador (5 µl de uma solução de 4 ng/µl - poly-A) ao lisado antes de homogeneizar.
- Adicionar 1 volume de etanol 70% (350 µl) ao lisado homogeneizado, e misturar bem pipetando. **Não centrifugar!**

- Transferir a amostra, incluindo qualquer precipitado que possa ter se formado, para uma MinElute Spin Column em um tubo de coleta 2 mL. Fechar o tudo com cuidado, e centrifugar por 15s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm). Descartar o conteúdo do tubo de coleta.
- Recoloque o SpinColumn no tubo de coleta e adicione 350 μ l de RW1. Centrifugar por 15s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para lavar a coluna. Descartar o conteúdo do tubo de coleta.
- Adicionar 10 μ l de DNase 1 estoque (stock) a 70 μ l de RDD (tubo 0,2 mL). Misturar pipetando gentilmente invertendo o tubo (DNase é sensível a desnaturação física). **Não vortexar!**
- Pipetar o mix de incubação DNase 1 (80 μ l) diretamente sobre uma membrana de sílica-gel MinElute, e coloque no tubo de coleta. Deixe em temperatura ambiente por 15 min.
- Adicionar 350 μ l de RW1 na SpinColumn, e centrifugar por 15s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para lavar a coluna. Descartar o conteúdo e o tubo de coleta.
- Transferir a SpinColumn para um novo tubo de coleta (2 mL). Adicionar 500 μ l de RPE à coluna. Centrifugar por 15s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para lavar a coluna. Descartar o conteúdo do tubo de coleta.
- Adicionar 500 μ l de etanol 80% à SpinColumn. Feche o tubo gentilmente e centrifugue por 2 min a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para secar a membrana de sílica-gel. Descartar o conteúdo e o tubo de coleta.
- Transferir a SpinColumn para um novo tubo de coleta (2 mL). Abrir a tampa da SpinColumn, e centrifugar por 5 min na maior velocidade. Descartar o conteúdo e o tubo de coleta. (secar a membrana).
- Para eluição, transferir a SpinColumn para um novo tubo de coleta (1,5 mL). Pipetar 12 μ l de água RNase-free diretamente no centro da membrana de sílica-gel. Fechar o tubo gentilmente, e centrifugar por 1 min na velocidade máxima para eluir. O volume final deve ser de 11 μ l.

ANEXO B

AMPLIFICAÇÃO DE RNA (MESSAGEAMP II aRNA AMPLIFICATION KIT – AMBION)

Procedimento:

- Colocar um volume máximo de 11 µl de RNA total ou o mRNA selecionado em um tubo 0,5 mL RNase free.
- Adicionar 1 µl do primer T7.
- Adicionar água Nuclease-free até um volume final de 12 µl, vortexar rapidamente para misturar, e então centrifugar para coletar mistura no fundo do tubo (**se o vol. for suficiente, não precisa colocar água**).
- Incubar por 10 min a 70°C em um termociclador (programa a-RT).
- Centrifugar as amostras rapidamente (~5 seg) para coletar as amostras do fundo do tubo. Colocar as misturar no gelo.
- À temperatura ambiente, preparar o *Reverse Transcription Master Mix* em um tubo nuclease-free.

| <i>Reverse Transcription Master Mix</i> (para uma única reação de 20 µl) | |
|--|-------------------------|
| Quantidade | componente |
| 2 µl | 10X First strand buffer |
| 4 µl | dNTP Mix |
| 1 µl | RNAse Inhibitor |
| 1 µl | ArrayScript |

- Misturar gentilmente por vortex. Centrifugar rapidamente (~5 seg) para coletar o *Reverse Transcription Master Mix* no fundo do tubo e colocar em gelo.
- Transferir 8 µl do *Reverse Transcription Master Mix* para cada amostra de RNA. Misturar pipetando (2/3 vezes), coletar a reação do fundo do tubo.
- Colocar as amostras por 2h a 42°C (programa RT-Ambion). Após este período, centrifugar rapidamente para coletar a reação do fundo do tubo. Colocar em gelo e imediatamente proceder à síntese da segunda fita.

- No gelo, preparar o *Second Strand Master Mix* em um tubo nuclelease-free na ordem listada no quadro a seguir.

| <i>Second Strand Master Mix</i> (para uma única reação de 100 μ l) | |
|--|---------------------------------|
| Quantidade | Componente |
| 63 μ l | Água nuclelease-free |
| 10 μ l | 10X <i>Second Strand Buffer</i> |
| 4 μ l | dNTP Mix |
| 2 μ l | DNA Polymerase |
| 1 μ l | RNAse H |

- Misturar gentilmente por vortex. Centrifugar rapidamente (~5 seg) para coletar o *Second Strand Master Mix* no fundo do tubo e colocar em gelo.
 - Transferir 80 μ l do *Second Strand Master Mix* para cada amostra. Misturar pipetando (2/3 vezes), então inverter o tubo (2/3 vezes), e centrifugar rapidamente para coletar a reação do fundo do tubo.
 - Colocar as amostras por 2h a 16°C. É importante resfriar o termociclador a 16°C antes de colocar as amostras (temp. maiores podem comprometer o RNA). **Tampa do termociclador sem aquecer, deixar tampa aberta!**
- colocar a água nuclelease-free (10 mL) para aquecer a 50-55°C por pelo menos 10 min.
- Após a incubação, colocar as amostras no gelo e proceder a purificação do cDNA.
- **checar se o tampão de ligação do cDNA apresenta precipitação, se for o caso, redissolver aquecendo a 37°C por mais de 10 min e vortexar. Resfriar a temperatura ambiente antes de utilizar.**
- Adicionar 250 μ l do tampão de ligação a cDNA a cada amostra, misturar pipetando (2/3 vezes), então inverter o tubo (2/3 vezes). Em seguida realizar um *spin* para coletar a reação no fundo do tubo. Seguir para o próximo passo rapidamente.
- **checar se o cDNA filter cartridge está colocado firmemente no wash tube.**
- **assegurar que o etanol foi adicionado ao tampão de lavagem (wash buffer).**
- Pipetar a amostra de cDNA com o tampão no centro do *cDNA filter cartridge*.

- Centrifugar por ~1 min a 10000 rpm, ou até que a mistura tenha passado pelo filtro.
- Descartar o líquido que atravessou a membrana e recolocar o *cDNA filter cartridge* no *wash tube*.
- Aplicar 500 µl do tampão de lavagem a cada *cDNA filter cartridge*.
- Centrifugar por ~1 min a 10000 rpm), ou até que o tampão de lavagem tenha passado pelo filtro.
- Descartar o líquido que atravessou a membrana e realizar um *spin* por mais um minuto para remover qualquer traço do tampão de lavagem.
- Transferir o *cDNA filter cartridge* para um *cDNA Elution Tube*.
- Aplicar 10 µl da água nuclease-free (pré-aquecida) no centro do filtro no *cDNA filter cartridge*.
- Deixe em temperatura ambiente por 2 min e então centrifugar por ~1,5 min a 10000 rpm, ou até que toda a água tenha passado pelo filtro.
- Eluir com uma segunda aplicação de água nuclease-free. O cDNA dupla fita estará agora no líquido eluído (~16 µl).
- A temperatura ambiente preparar um IVT Master Mix pela adição dos reagentes listados no quadro a seguir em um tubo de microcentrifuga nuclease-free.

| <i>IVT Master Mix</i> para uma única reação | |
|---|------------------------|
| Quantidade | Componente |
| 4 µl | T7 ATP Soln (75mM) |
| 4 µl | T7 CTP Soln (75mM) |
| 4 µl | T7 GTP Soln (75mM) |
| 4 µl | T7 UTP Soln (75mM) |
| 4 µl | T7 10X Reaction Buffer |
| 4 µl | T7 Enzyme Mix |
| | |
| 40 µl | Volume total |

- Misturar bem gentilmente por vortex. Centrifugar rapidamente (~5 seg) para coletar o *IVT Master Mix* no fundo do tubo e colocar no gelo.
 - Transferir 24 μ l *IVT Master Mix* para cada amostra. Misturar pipetando (2/3 vezes), então inverter o tubo (3/4 vezes), e centrifugar rapidamente para coletar a reação no fundo do tubo.
 - Colocar os tubos a 37° C por 5h.
 - Adicionar 60 μ l de água nuclease-free a cada amostra de aRNA (volume final 100 μ l). Misturar gentilmente por vortex.
- colocar a água nuclease-free (10 mL) para aquecer a 50-60°C por pelo menos 10 min.
- para cada amostra colocar um *aRNA Filter Cartridge* em um *aRNA Collection Tube*.
- resfriar o etanol 70%.
- Adicionar 350 μ l de tampão de ligação aRNA (*binding buffer*) a cada amostra de aRNA. Proceder para o próximo passo imediatamente.
 - Adicionar 250 μ l de etanol 100% a cada amostra de aRNA, e misturar pipetando 3x. **Não vortexar e não centrifugar!** Ao adicionar o etanol não demorar a realizar o próximo passo (perda de aRNA, estado de semi-precipitação).
 - Pipetar cada amostra (com etanol) para o centro do filtro de um *aRNA Filter Cartridge*.
 - Centrifugar por ~1 min a 10000 rpm. Continuar até que a mistura tenha passado pelo filtro.
 - Descartar o líquido que atravessou e recolocar o *aRNA Filter Cartridge* no *aRNA Collection Tube*.
 - Aplicar 650 μ l de Wash Buffer a cada *aRNA Filter Cartridge*.
 - Centrifugar por ~1 min a 10000 rpm. Continuar até que a mistura tenha passado pelo filtro.
 - Descartar o líquido que atravessou e realizar um spin no *aRNA Filter Cartridge* por ~1 min para remover qualquer traço de de Wash Buffer.
 - Transferir os filtros para novos tubos de coleta.
 - No centro dos filtros adicionar 100 μ l da água Nuclease-free pré-aquecida (50-60°C).
 - Deixar na temperatura ambiente por 2 min e então centrifugar por ~1,5 min a 10000 rpm, ou até que a água tenha passado pelo filtro.
 - O aRNA estará agora no tubo de coleta ~100 μ l de água nuclease-free.
 - Adicionar 10 μ l de 5M NH₄OAc ao aRNA purificado.
 - Adicionar 275 μ l de etanol 100%. Misturar bem e incubar a -20° C por 30 min.

- Centrifugar na maior velocidade por 15 min. Remover cuidadosamente e descartar o supernatante.
- Lavar o pellet com 500 μ l de etanol 70% resfriado, centrifugar novamente, e remover o etanol 70%.
- Para remover o restante de etanol, realizar um spin e aspirar qualquer resíduo de fluido.
- Secar o pellet ao ar.
- Ressuspender o pellet de aRNA utilizando 20 μ l água RNase-free.
- Parar o procedimento colocando a amostra a -20°C .

ANEXO C

TRANSCRIÇÃO REVERSA (SUPERScript™ III FIRST-STRAND SYNTHESIS SUPERMIX – INVITROGEN)

Observações:

- Manter todo o material em gelo;
- Após o preparo da mistura de anelamento, transferi-la para o termociclador pré-aquecido (65°C);

Procedimento:

- Misturar e centrifugar rapidamente cada um dos componentes antes de utilizar. Pré-aquecer o termociclador a 65°C;
- Preparar a seguinte mistura em um tubo de 0,2 ml (PCR) no gelo.

| <i>Mix de Reação 1 (para cada reação)</i> | |
|--|-----------------------|
| Primer (random hexamers) | 1µl |
| Annealing buffer | 1µl |
| RNA total (até 5µg) | 4µl (~ 0,28µg de RNA) |
| Água RNase/DNase free | 2µl |
| Volume final: 8µl (20µl = +/- 4 tubos de reação) | |

- Em geral a concentração de RNA extraído de *pool* de cinco embriões e amplificado tem sido de ~70ng/µl (~0,07µg/µl).

- Incubar em termociclador a 65°C por 5 min, e então colocar imediatamente em gelo por pelo menos 1 min. Centrifugar rapidamente;
- Adicionar ao tubo no gelo:

| <i>Mix de Reação 2 (para cada reação)</i> | |
|---|-------|
| 2X first-strand Reaction Mix | 10 µl |
| SuperScript [™] III/RNaseOUT [™] Enzyme Mix | 2 µl |
| Volume final: 20 µl | |

- Misturar o tubo gentilmente (pipetando) e centrifugar rapidamente;
- Incubar a 25°C por 5-10 min; 50°C por 50 min; e terminar a reação a 85°C por 5 min, e então colocar em gelo;
- Estocar a -20°C até a utilização.

Nota: 10% do volume da reação de PCR deve ser de cDNA não diluído (por exemplo, para uma reação de qPCR de 25µl, utilizar 2,5 µl de cDNA não diluído).

ANEXO D

GEL DE ACRILAMIDA (8%)

Preparo das Placas:

- Passar 1mL de Solução de Bind Silane (faz o gel aderir à placa) na placa dentada, espalhar bem (com papel toalha) e deixar secar por 10 min;
 - Na placa inteira, passar Rain-X uma primeira vez (com papel toalha); deixar secar por 10 min; polir até dar brilho, passar novamente, espalhar (sem polir) e deixar secar por 10 min.
- **Caso a placa nunca tenha sido tratada com Rain-X, repetir estes passos por cinco vezes.**
- **É importante que as placas que foram tratadas com Rain-X estejam distantes das placas tratadas com Bind Silane.**

Preparo do Gel:

- Preparar uma solução de Acrilamida na concentração desejada e estocar na geladeira;
- Preparar o gel de Poliacrilamida Nativo (na concentração adequada e volume relativo ao tamanho da placa):

| Reagentes | 50 mL (placa de 25 cm) | 70 mL (placa de 35 cm) |
|----------------------------|------------------------|------------------------|
| Solução de Acrilamida | 50 mL | 70 mL |
| Persulfato de Amônia (10%) | 360 µL | 500 µL |
| TEMED | 36 µL | 50 µL |

- Deixar o gel polimerizar por no mínimo 4h;
- Descolar levemente as duas placas para verificar se a placa inteira realmente se soltará do gel após a eletroforese. Caso não se solte, é melhor descartá-lo e preparar outro gel;
- Colocar na cuba de corrida com TBE 1X, lavar as canaletas com o próprio tampão e retirar as bolhas;
- Carregar as amostras e correr o gel com o protocolo próprio.

Coloração do Gel:

- Após a corrida, descolar cuidadosamente as placas, utilizando uma pequena espátula de metal;
- Cobrir a placa contendo o gel com 800 mL de Solução de Fixação e deixar agitando por 10 min;
- Descartar a Solução de Fixação;
- Cobrir o gel com 800 mL de Solução de Coloração e deixar agitando:
 - Géis a 5% e 8% - 15 min
 - Géis a 12% - 30 min
- Descartar a Solução de Coloração;
- Lavar o gel duas vezes com água, rapidamente;
- Cobrir o gel com 800 mL de Solução de Revelação. Deixar em agitação por 10 min ou até ser observada a presença de fragmentos menores que 30pb;
- Descartar a Solução de Revelação;
- Lavar com água por duas vezes, para retirar o excesso de hidróxido de sódio;
- Secar o gel imediatamente, frente e verso, com papel toalha, cobrir com filme de PVC e identificar os indivíduos presentes no gel;
- Digitalizar imediatamente a imagem do gel. Se demorar, o gel escurece demais e perde um pouco a visualização. Caso demore, a digitalização deve ser feita no dia seguinte, pois o gel volta a clarear.

Solução de Acrilamida (8%)

| Reagentes | 1L | 2L |
|----------------------------|--------|----------|
| Acrilamida 40% | 200 mL | 400 mL |
| TBE 10X | 100 mL | 200 mL |
| H ₂ O destilada | 700 mL | 1.400 mL |

Solução de Bind Silane

| | |
|---------------|------|
| Reagentes | 1 mL |
| Etanol 95% | 1 mL |
| Ácido acético | 5 µL |
| Bind Silane | 3 µL |

Solução de Coloração

| | |
|----------------------------|--------|
| Reagentes | 800 mL |
| Solução de Prata 12% | 12 mL |
| H ₂ O destilada | 788 mL |

Solução de Fixação

| | |
|----------------------------|--------|
| Reagentes | 800 mL |
| Etanol | 80 mL |
| Ácido acético glacial | 8 mL |
| H ₂ O destilada | 712 mL |

Solução de Revelação

| | |
|----------------------------|--------|
| Reagentes | 800 mL |
| Hidróxido de Sódio 30% | 80 mL |
| Formaldeído 37% | 8 mL |
| H ₂ O destilada | 712 mL |