

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**CAMPUS DE CURITIBANOS**

**CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS**

**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**JÚLIA KOCH**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA  
VETERINÁRIA - ÁREA DE BIOTECNOLOGIA APLICADA À REPRODUÇÃO  
ANIMAL**

Curitibanos-SC

2017.1

**JÚLIA KOCH**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA  
VETERINÁRIA - ÁREA DE BIOTECNOLOGIA APLICADA À REPRODUÇÃO  
ANIMAL**

Relatório de estágio curricular supervisionado apresentado como requisito parcial para a conclusão do curso de Medicina Veterinária junto à Universidade Federal de Santa Catarina – Campus de Curitibanos, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta e supervisão do Prof. Dr. Alfredo Quites Antoniazzi.

Curitibanos-SC

2017.1

JÚLIA KOCH

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA  
VETERINÁRIA - ÁREA DE BIOTECNOLOGIA APLICADA À REPRODUÇÃO  
ANIMAL**

Relatório de estágio curricular supervisionado apresentado como requisito parcial para a conclusão do curso de Medicina Veterinária junto à Universidade Federal de Santa Catarina – Campus de Curitibanos, defendido e aprovado em 03 de julho de 2017, pela seguinte Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta – Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

---

Prof. Dr. Valério Valdetar Marques Portela Jr. – Membro da banca  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

---

Prof. Dr. Luiz Ernani Henkes – Membro da banca  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

## RESUMO

O presente relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária realizado no período de 9 de janeiro a 14 de abril de 2017, como requisito parcial estabelecido pela Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Médico Veterinário. O estágio foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep) da Universidade Federal de Santa Maria, onde o objetivo foi desenvolver atividades relacionadas à produção *in vitro* de embriões (PIVE) por fecundação *in vitro* (FIV); quatro procedimentos completos de clonagem por transferência nuclear e seis de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), seguidos de tratamentos específicos relacionados à técnica, com posterior análise sobre o desenvolvimento embrionário, genético e molecular. Também foi possível realizar três coletas de ovários bovinos em frigorífico, seguidas de treze procedimentos de aspiração folicular, busca, seleção e maturação oocitária; duas rotinas de cultivo de células do corpo lúteo e acompanhamento de duas rotinas de cultivo de células da granulosa; quatro cultivos de células primárias para o uso na clonagem por transferência nuclear; duas análises em microscopia de epifluorescências (IF) tendo como objetivo identificar proteínas envolvidas no processo de apoptose, pluripotência e competência de implantação embrionária; diversas reações em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) buscando quantificar genes e testar novos iniciadores (*primers*) relacionados com os interesses das atuais linhas de pesquisa do laboratório; além de assistir a duas defesas de mestrado, duas defesas e uma qualificação de doutorado. As atividades realizadas e a vivência em um laboratório durante o estágio curricular foram de suma importância para a minha formação como Médica Veterinária. Ampliar os conhecimentos sobre a biotecnologia da reprodução animal foi fundamental para elucidar a importância da desta área, sobre o melhoramento genético e reprodutivo dos rebanhos, além de auxiliar a solucionar problemas reprodutivos em humanos e animais.

**Palavras-chave:** PIVE, ICSI, clonagem, bovinos, qPCR, IF.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Sistema a vácuo de aspiração folicular.....	16
<b>Figura 2</b> - Aspiração folicular <i>in vitro</i> .....	17
<b>Figura 3</b> - Procura e seleção dos oócitos bovinos .....	18
<b>Figura 4</b> - Oócito maturado, apresentando <i>cumulus</i> expandido (CC = células do <i>cumulus</i> ; O = oócito) .....	19
<b>Figura 5</b> - Avaliação de clivagem .....	22
<b>Figura 6</b> - Avaliação de desenvolvimento embrionário – D7.....	23
<b>Figura 7</b> - Injeção intracitoplasmática de espermatozoides.....	26
<b>Figura 8</b> - Equipamentos de micromanipulação.....	27
<b>Figura 9</b> - Curva de amplificação da ACTB .....	37
<b>Figura 10</b> - Curva padrão da ACTB .....	37
<b>Figura 11</b> - Curva de dissociação da ACTB .....	38
<b>Figura 12</b> - Embrião submetido à técnica de imuno-histoquímica para a detecção da proteína H2A.x Ser139ph .....	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Detalhamento das atividades de produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos realizadas durante o período de estágio.....	13
<b>Tabela 2</b> - Detalhamento das atividades relacionadas com cultivo de células primárias realizadas durante o período de estágio.....	13
<b>Tabela 3</b> - Detalhamento das atividades de biologia molecular realizadas durante o período de estágio.....	14
<b>Tabela 4</b> - Detalhamento das atividades realizadas a campo ligadas ao BioRep durante o período de estágio.....	14
<b>Tabela 5</b> - Detalhamento das atividades gerais do laboratório desenvolvidas durante o período de estágio.....	14
<b>Tabela 6</b> - Avaliação da motilidade e vigor pré e pós percoll do sêmen utilizado para as rotinas de FIV e ICSI do BioRep .....	21
<b>Tabela 7</b> - Quantidade de amostras extraídas através da técnica de TRIzol®, bem como, a média de RNA quantificado após a extração.....	34

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACTB	$\beta$ -actina.
BioRep	Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal.
CCOs	Complexos <i>Cumulus</i> -oócito.
cDNA	DNA complementar.
CDX2	Fator de transcrição específico do intestino.
CIV	Cultivo <i>in vitro</i> de embriões.
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono.
Cq	Valor de ciclo.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
D7	Dia 7.
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> .
FGF18	Fator de crescimento fibroblástico 18.
FIV	Fecundação <i>in vitro</i> .
FSH	Hormônio folículo-estimulante.
g	Grama.
H2A.xSer139ph	Fosforilação da Serina 139 da Histona H2A.x.
IA	Inseminação Artificial.
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides.
IF	Imunofluorescência.
IU	Unidade internacional.
LH	Hormônio luteinizante.
M	Molar.
mg	Miligramas.
MIV	Maturação de oócitos <i>in vitro</i> .
ml	Mililitro.
mm	Milímetros.
mM	Micromolar.
mRNA	RNA mensageiro.
N <sub>2</sub>	Nitrogênio.
ng	Nanogramas.

O <sub>2</sub>	Oxigênio.
Oct-4	<i>Octamer-binding transcription factor 4.</i>
PA	Partenogenéticos.
PBS	Solução salina fosfatada.
PCR	Reação em cadeia da Polimerase.
pH	Potencial hidrogeniônico.
PHE	Penicilina, hipotaurina e epinefrina.
PIV	Produção <i>in vitro</i> .
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões.
RNA	Ácido Ribonucleico.
RPL13	Proteína Ribossomal L13.
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa quantitativa em tempo real.
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real.
rpm	Rotações por minuto.
RS	Rio Grande do Sul.
SCNT	Transferência nuclear de células somáticas.
SOF	Fluido sintético de oviduto.
TALP	<i>Tyrodé's albumin lactate and pyruvate.</i>
TRIzol	Ticionato de guanidine-fenol-clorofórmio.
UBQ	Ubiquitina.
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria.
°C	Graus Celsius.
3BHSD	<i>3β-Hydroxysteroid dehydrogenase.</i>
6-DMAP	6-(Dimethylamino)purine.
®	Marca registrada.
5'-3'	Cinco linha, três linha.
µg	Microgramas.
µL	Microlitro.
µM	Micromolar.
µm	Micrometro.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS</b> .....	13
2.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS .....	15
<b>2.1.1 Maturação <i>in vitro</i> de oócitos</b> .....	15
2.1.1.1 Coleta de ovários no frigorífico e aspiração folicular .....	15
2.1.1.2 Procura e seleção dos oócitos .....	17
2.1.1.3 Maturação dos oócitos .....	18
<b>2.1.2 Fecundação <i>in vitro</i></b> .....	20
<b>2.1.3 Desnudamento e avaliação da clivagem</b> .....	22
<b>2.1.4 Avaliação do desenvolvimento embrionário</b> .....	23
<b>2.1.5 Embriões partenogénéticos</b> .....	24
<b>2.1.6 Embriões produzidos através da técnica injeção intracitoplasmática de espermatozoides em oócitos</b> .....	25
<b>2.1.7 Clonagem por transferência nuclear</b> .....	27
2.2 CULTIVO DE CÉLULAS PRIMÁRIAS .....	28
<b>2.2.1 Cultivo de células do corpo lúteo</b> .....	28
<b>2.2.2 Cultivo de células da granulosa</b> .....	29
<b>2.2.3 Cultivo de fibroblastos para clonagem</b> .....	31
2.3 BIOLOGIA MOLECULAR .....	32
<b>2.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real</b> .....	32
2.3.1.1 Extração e quantificação de RNA .....	33
2.3.1.2 Transcrição Reversa (cDNA) .....	35
2.3.1.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	36

2.3.2 Detecção de proteína por imunofluorescência.....	38
3 CONCLUSÃO .....	40
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

A pesquisa científica brasileira está em pleno desenvolvimento, porém, ainda se mantém distante da produção científica de países desenvolvidos. Com isso, os programas de pesquisa mantidos pelo governo têm se tornado de suma importância para o crescimento e formação científica e tecnológica de novos pesquisadores, bem como, de novas técnicas e conhecimentos por eles desenvolvidos. Embora tenha ocorrido um crescimento na quantidade de publicações nos últimos anos, a visibilidade e o impacto da maioria dos trabalhos brasileiros ainda são modestos (OLIVEIRA, 2016).

Pensando em melhorar os aspectos acima citados, a inserção e o treinamento de alunos de graduação através de programas como de iniciação científica e a oportunidade de estágios em laboratórios de pesquisa, podem contribuir para o avanço do futuro da ciência brasileira. Com o intuito de seguir na área científica, o estágio curricular supervisionado do presente relatório foi realizado integralmente no Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep), situado no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal de Santa Maria, totalizando 450 horas de atividades desenvolvidas.

O BioRep foi fundado em 1997 e desde então, desenvolve pesquisas voltadas para a área de biotecnologias da reprodução animal, buscando elucidar questionamentos de fisiopatologia da reprodução através da utilização de diversas biotécnicas. Atualmente, o laboratório é coordenado pelos professores Alfredo Quites Antoniazzi, Paulo Bayard Dias Gonçalves e Fábio Vasconcellos Comim, enquanto que o grupo de pesquisa é constituído por 6 doutorandos, 2 mestrados, 7 alunos de iniciação científica e 1 técnico de laboratório. Atualmente, as principais linhas de pesquisa do laboratório envolvem: desenvolvimento folicular e ovulação; regulação da maturação de oócitos; clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT); Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), tendo principalmente a espécie bovina como modelo de estudo, e síndrome do ovário policístico, estudados em ratos e ovinos.

A biotecnologia da reprodução animal é uma área inegavelmente importante da pesquisa científica, já que através dela tornou-se possível compreender e elucidar muitos aspectos da fisiologia reprodutiva feminina e masculina; produzir animais geneticamente superiores; desenvolver técnicas capazes de deslindar a infertilidade na espécie humana; restituir espécies ameaçadas de extinção; formar bancos de germoplasma animal; e produzir órgãos humanos através de transgenia ou clonagem (GONÇALVES et al., 2014). Além disso, ao pensar em eficiência reprodutiva dos rebanhos atuais, é primordial conceder mérito ao uso das biotecnologias aplicadas à reprodução (VISINTIN et al., 2008).

Ademais do que já foi esclarecido, há uma gama de questionamentos e impasses reprodutivos a serem desvendados. Por isso, o objetivo deste trabalho foi relatar as atividades desenvolvidas durante o período de estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária realizado no Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal da UFSM, bem como, a importância do uso de cada biotécnica sobre o avanço técnico, científico e econômico.

## 2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades realizadas pelo grupo de pesquisa do BioRep ocorrem de forma dinâmica e bastante intensa, possibilitando aos estagiários a oportunidade de acompanhar práticas de pesquisa básica. As tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 apresentam a frequência e a descrição das atividades realizadas durante o período de estágio, separadas em grupos de afinidade e na ordem a qual serão abordadas.

**Tabela 1:** Detalhamento das atividades de produção *in vitro* de embriões bovinos realizadas durante o período de estágio.

Atividades Desenvolvidas	Frequência*
Preparo de meios de trabalho	8
Coleta ovários no frigorífico	3
Maturação <i>in vitro</i> de oócitos	13
Seleção espermática por técnica de mini <i>PERCOLL</i>	3
Acompanhamento de micromanipulação de oócitos (clonagem)	4
Acompanhamento de micromanipulação de oócitos (ICSI)	6
Fertilização <i>in vitro</i> de oócitos	1
Ativação de oócitos para a produção de embriões ativados partenogeneticamente	2
Avaliação de clivagem dos zigotos	2
Manipulação de oócitos no micromanipulador	3
Avaliação do desenvolvimento embrionário	1

\* A frequência refere-se ao número de vezes que a atividade foi desenvolvida ao longo do período total de estágio.

**Tabela 2:** Detalhamento das atividades relacionadas com cultivo de células primárias realizadas durante o período de estágio.

Atividades Desenvolvidas	Frequência*
Cultivo de células do corpo lúteo	2
Cultivo de células da granulosa	2
Cultivo de células primárias (fibroblastos) para clonagem	4

\* A frequência refere-se ao número de vezes que a atividade foi desenvolvida ao longo do período total de estágio.

**Tabela 3:** Detalhamento das atividades de biologia molecular realizadas durante o período de estágio.

<b>Atividades Desenvolvidas</b>	<b>Frequência*</b>
Extração de RNA por coluna (PicoPure™ RNA Isolation Kit)	1
Extração de RNA por técnica de mini TRIzol®	2
Extração de RNA por técnica de TRIzol®	3
Quantificação de RNA	2
Transcrição reversa (cDNA)	6
Curva Padrão de diluição de cDNA	4
Reação em cadeia da Polimerase em tempo real (qRT-PCR)	5
Diluição de Primers	3
Teste de padronização de Primers	4
Imunofluorescência de embriões (IF)	2
Fixação de embriões para posterior IF	2
Fixação de oócitos maturados para posterior análise de maturação nuclear por fluorescência	1

\* A frequência refere-se ao número de vezes que a atividade foi desenvolvida ao longo do período total de estágio.

**Tabela 4:** Detalhamento das atividades realizadas a campo ligadas ao BioRep durante o período de estágio.

<b>Atividade Desenvolvida</b>	<b>Frequência*</b>
Diagnóstico de gestação em bovinos pós inseminação artificial	1
Diagnóstico de gestação em bovinos pós transferência de embriões clonados	1

\* A frequência refere-se ao número de vezes que a atividade foi desenvolvida ao longo do período total de estágio.

**Tabela 5:** Detalhamento de atividades gerais do laboratório desenvolvidas durante o período de estágio.

<b>Atividades Desenvolvidas</b>	<b>Frequência*</b>
Preparo de meios de estoque	7
Discussão de artigo científico	4
Participação em defesas de mestrado; defesas e qualificação de doutorado	5
Auxílio na lavagem, embalagem e esterilização dos materiais de laboratório	Diariamente

\* A frequência refere-se ao número de vezes que a atividade foi desenvolvida ao longo do período total de estágio.

## 2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

A PIVE tem como vantagem acelerar o melhoramento genético dos rebanhos ao utilizar fêmeas geneticamente privilegiadas como doadoras de oócitos; utilizar gametas de fêmeas superiores, que estão impossibilitadas de gestar; formar bancos de germoplasma com o intuito de preservar raças ou linhagens de interesse. Além do uso prático, a PIVE também é de suma importância no aspecto científico, possibilitando o estudo e elucidação de eventos fisiológicos e bioquímicos ligados ao desenvolvimento inicial do oócito ou embrião, bem como, aprimoramento de biotécnicas na espécie animal de interesse ou com a utilização de espécies modelos (GONÇALVES et al., 2014). Essa biotécnica envolve diversas etapas, que vão desde o preparo dos meios que serão utilizados para a manutenção dos gametas, coleta dos oócitos, maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo (CIV) dos zigotos. Durante o estágio curricular no BioRep, as rotinas de PIVE ocorreram semanalmente, tendo sido possível acompanhar todas as etapas que serão detalhadas a seguir.

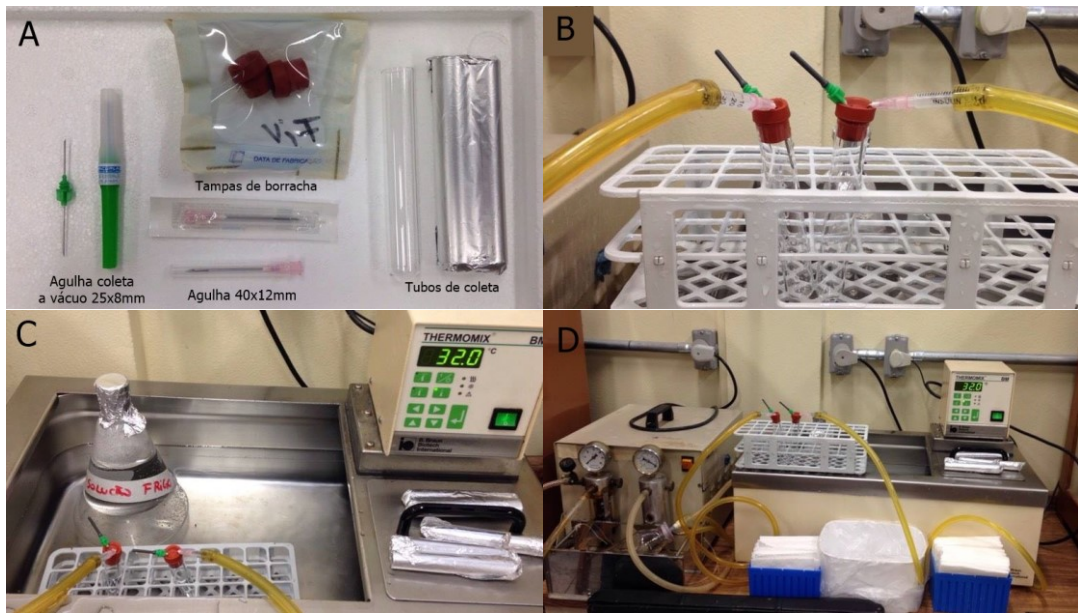
### 2.1.1 Maturação *in vitro* de oócitos

No primeiro dia de rotina, uma sequência de eventos deveria ocorrer. Em ordem cronológica, são eles: coleta de ovários no frigorífico, preparo dos equipamentos e materiais de punção, preparo do meio de maturação, punção dos folículos ovarianos, busca e seleção dos complexos cumulus-oócito (CCOs) e maturação dos oócitos.

#### 2.1.1.1 Coleta de ovários no frigorífico e aspiração folicular

A coleta dos ovários para o BioRep foi realizada no Frigorífico Silva – *Best Beef*, localizado na cidade de Santa Maria – RS. Os ovários coletados eram acondicionados em uma garrafa térmica contendo solução fisiológica aquecida entre 30-35 °C.

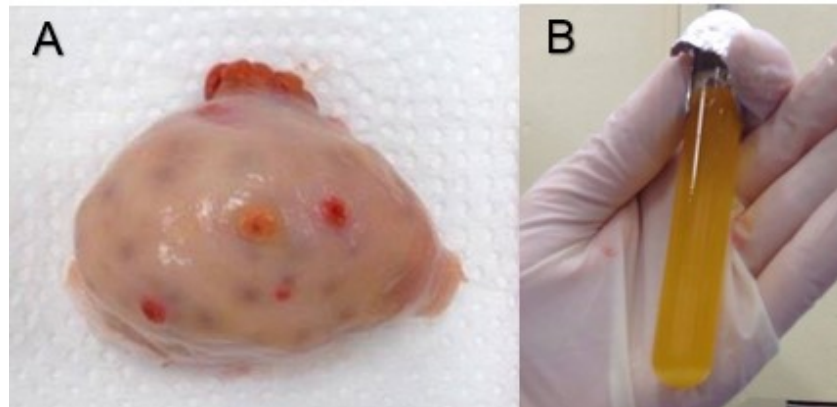
Chegando ao laboratório, os ovários eram lavados em solução fisiológica aquecida a aproximadamente 30-35 °C e mantidos em béqueres em banho maria a 32-33 °C até o momento da aspiração folicular *in vitro*. A aspiração folicular era realizada com auxílio de uma bomba de vácuo (volume de aspiração de 12 ml de água por minuto), acoplada a agulhas 25x8 mm. O sistema de punção está representado na figura 1.



**Figura 1:** Sistema à vácuo de aspiração folicular. **A)** Materiais usados para montar sistema de punção. **B)** Tubo de coleta preparado para aspiração folicular. **C)** Solução fisiológica aquecendo em banho-maria a 32 °C. **D)** Sistema de aspiração folicular completo. **Fonte:** arquivo pessoal.

A aspiração folicular era realizada por dois operadores. Primeiramente os ovários eram secados em papel toalha e então, apenas os folículos selecionados com 2 a 8 mm de diâmetro eram aspirados. O operador deveria entrar com a agulha pela cortical do ovário, até atingir o interior do folículo selecionado, realizando movimentos circulares com a agulha para aspirar o conteúdo folicular (figura 2). Quando o tubo de ensaio era preenchido por líquido folicular, era fechado com papel alumínio e colocado em uma raque no banho maria por no mínimo 10 minutos, tempo necessário para a sedimentação dos CCOs.





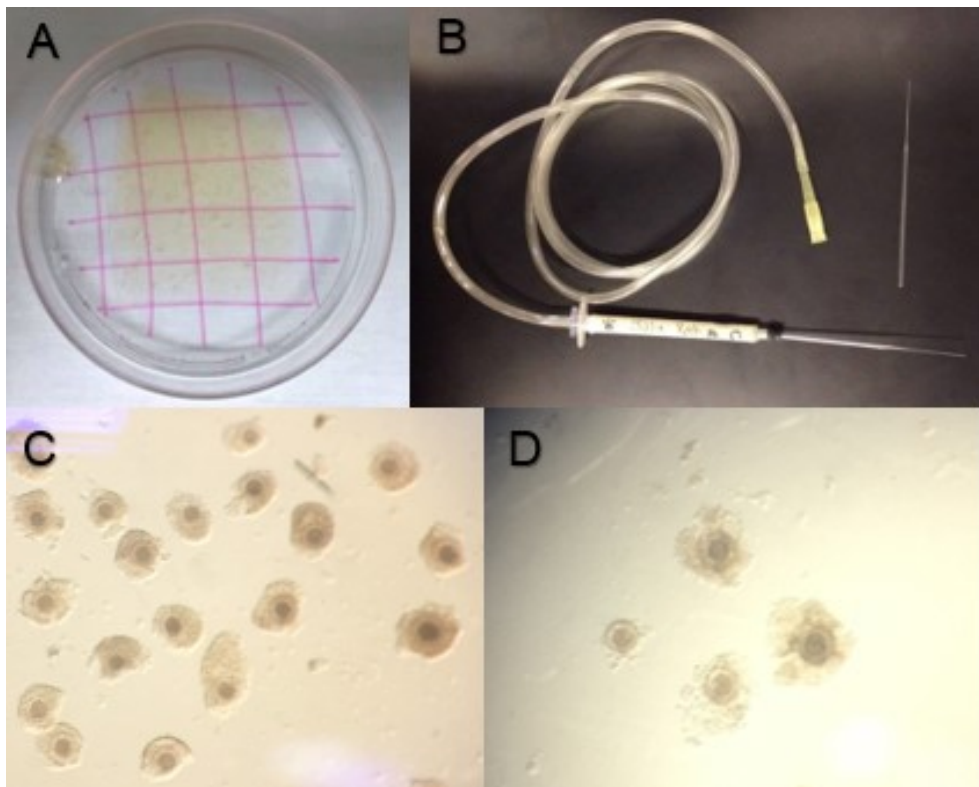
**Figura 2:** Aspiração folicular *in vitro*. **A)** Ovário bovino a ser aspirado. **B)** Pellet contendo CCOs. **Fonte:** arquivo pessoal.

#### 2.1.1.2 Procura e Seleção dos oócitos

Após decorrido o tempo de sedimentação dos CCOs, os tubos eram levados para a sala de cultivo, onde era retirado o sobrenadante deixando aproximadamente 1,5 ml de conteúdo no tubo. O sobrenadante (líquido folicular) era realocado em um tubo de ensaio estéril e submetido a centrifugação a 3.000 rpm durante 5-10 minutos para posterior utilização. Com auxílio de um pipetador, o *pellet* era homogeneizado e distribuído em uma placa de Petri de 100 mm de diâmetro para a procura dos oócitos (figura 3A). Os oócitos encontrados eram retirados da placa com auxílio de uma micropipeta de vidro (confeccionada a partir de um tubo de microhematócrito) acoplada em um sistema de sucção (confeccionado com um equipo de soro; figura 3B), e então, colocados em uma placa de 35 mm de diâmetro contendo aproximadamente 2 ml de líquido folicular centrifugado.

Após a procura, os CCOs contidos em todos os tubos eram selecionados de acordo com a sua qualidade, avaliada através da homogeneidade do citoplasma, do número de camadas e a compactação das células do *cumulus* (LEIBFRIED & FIRST, 1979; figuras 3C e 3D). Os oócitos classificados como de qualidade 1 possuem uma camada espessa e compacta de células do *cumulus* envolta de todo o oócito e o ooplasma homogêneo. Nos CCOs de qualidade 2 a camada de células do *cumulus*

não circunda todo o oócito e o ooplasma apresenta algumas granulações distribuídas homogeneamente. Já os de qualidade 3 não possuem células do *cumulus* (desnudos) ou apresentam o *cumulus* expandido e o ooplasma retraído, degenerado, vacuolizado ou fragmentado. Para as rotinas do BioRep, apenas os oócitos de qualidade 1 e 2 eram submetidos à maturação. Após a seleção, eles eram lavados em uma placa de 35 mm contendo 2 ml de meio de maturação.



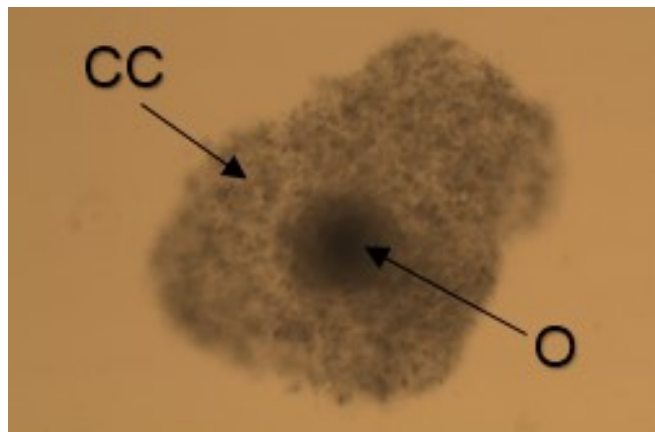
**Figura 3:** Procura e seleção dos oócitos bovinos. **A)** Placa de procura. **B)** Sistema de sucção para a manipulação dos oócitos. **C)** Oócitos de boa qualidade com citoplasma homogêneo e boa quantidade de células do *cumulus*. **D)** Oócitos não usados para a maturação. **Fonte:** arquivo pessoal.

#### 2.1.1.3 Maturação dos oócitos

O meio de maturação dos oócitos era preparado pelo aluno de pós-graduação responsável pela rotina e eventualmente por algum dos estagiários experientes. O

meio de maturação era composto por TCM-199<sup>®</sup> contendo sais de Earle e *L-glutamine* (Gibco) suplementado com 25 mM de HEPES, 0,2 mM de ácido pirúvico, 2,2 mg/ml de bicarbonato de sódio, 5.0 µg/ml de LH (Bioniche, Belleville, ON, Canada), 0.5 µg/ml de FSH (Bioniche, Belleville, ON, Canada), 10% de soro fetal bovino (Gibco Labs, Grand Island, NY, USA), 100 IU/ml de penicilina e 50 µg/ml de sulfato de estreptomicina. Após o preparo do meio, ele era mantido em estufa de cultivo com atmosfera controlada a 5% de CO<sub>2</sub> em ar, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C. Os meios deveriam estar prontos 2 horas antes do uso e armazenados na incubadora para estabilizar a temperatura e o pH.

Os oócitos selecionados foram lavados em meio de maturação e distribuídos em grupos de aproximadamente 30-40 oócitos. Cada grupo foi transferido para um poço de uma placa Nunc<sup>®</sup> contendo 500 µl de meio de maturação e incubados em atmosfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C por 22 a 24 horas. O oócito considerado maturado apresentava o *cumulus* expandido, como está representado na figura 4. Durante o período de estágio foram colocados aproximadamente 1.040 oócitos para maturar. Para as rotinas de ICSI e clonagem, além da expansão das células do *cumulus* era avaliada a extrusão do 1º corpúsculo polar como indicativo de maturação nuclear.



**Figura 4:** Oócito maturado, apresentando *cumulus* expandido (CC = células do *cumulus*; O = oócito).

**Fonte:** arquivo pessoal.

### 2.1.2 Fecundação *in vitro*

O meio de fecundação era preparado no mínimo duas horas antes do uso, ou seja, antes do término do tempo de maturação. Ele era composto por TALP-Fert suplementado com 6 mg/ml de albumina sérica bovina, 25 µg/ml de piruvato de sódio, 10 µg/ml de heparina, 30 µg/ml de penicilamina, 15 µM hipotaurina, 1 µM de epinefrina, 100 IU/ml de penicilina e 50 µg/ml de sulfato de estreptomicina. É importante que ele contenha os agentes que irão promover uma boa capacitação dos espermatozoides, sendo eles, a heparina que promove a capacitação dos espermatozoides e o PHE que permite a hiperativação dos espermatozoides, já que é nesse meio que os gametas masculinos irão encontrar os gametas femininos para fecundá-los. Após o preparo, o meio era transferido para a incubadora contendo atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C.

Para a fecundação era necessário também o preparo dos meios *Percoll* 90% e 45%, que quando dispostos em forma de gradiente e submetidos à separação mecânica são capazes de selecionar os espermatozoides viáveis. O *Percoll* 90% é constituído por *Percoll* (Amersham Biosciences®) e 100 µl/ml de TALP-Sperm. Já o *Percoll* 45% é composto por *Percoll* 90% e TALP-Sperm 1x (TALP-Sperm 10x diluído em água Milli-Q na proporção 1:10). Os dois *Percolls* devem ser mantidos a 4 °C até o momento em que serão montados os gradientes. Quando completado o tempo de maturação dos oócitos, era iniciada a seleção espermática. O primeiro passo era montar o gradiente de *Percoll* em microtubos de 1,5 ml, de forma com que o *Percoll* 45% ficasse sobre o *Percoll* 90% e então, deixado em banho-maria a 37 °C. As palhetas contendo o sêmen de interesse eram descongeladas e analisadas quanto a motilidade e o vigor, conforme a tabela 6. As palhetas utilizadas para as rotinas de FIV e ICSI eram compradas de centrais de congelamento.

Após a análise, 100 µl do sêmen era pipetado sobre o gradiente de *Percoll* cuidando para não misturar o sêmen com a coluna de *Percoll*. Então, o gradiente de *Percoll* contendo o sêmen era centrifugado a 37 °C por 2 minutos a 14.000 g. Após a centrifugação, todo o *Percoll* 45% era removido e 1 ml de meio TALP-Fert (sem heparina, hipotaurina, epinefrina e penicilamina) era adicionado ao conteúdo restante

no microtubo. Após a adição do meio TALP-Fert, uma nova centrifugação era realizada durante 45 segundos a 9.000 g e 37 °C. Ao final da segunda centrifugação, formava um *pellet* no fundo do microtubo contendo os espermatozoides com boa motilidade e vigor, então, era removido aproximadamente 1 ml do sobrenadante. O *pellet* era homogeneizado e a motilidade e vigor espermáticos foram avaliados novamente para saber a porcentagem de espermatozoides viáveis após o procedimento de seleção espermática (conforme tabela 6). A concentração espermática do *pellet* foi avaliada em Câmara de Neubauer e ajustada com o meio FERT, quando necessário, afim de obter uma dose inseminante de  $1 \times 10^6$ /ml de meio.

**Tabela 6:** Avaliação da motilidade e vigor pré e pós percoll do sêmen utilizado para as rotinas de FIV e ICSI do BioRep. Sêmen utilizado era proveniente de um touro da raça Jersey (Sentry - 147JE06173) adquiridas da empresa TAG do Brasil.

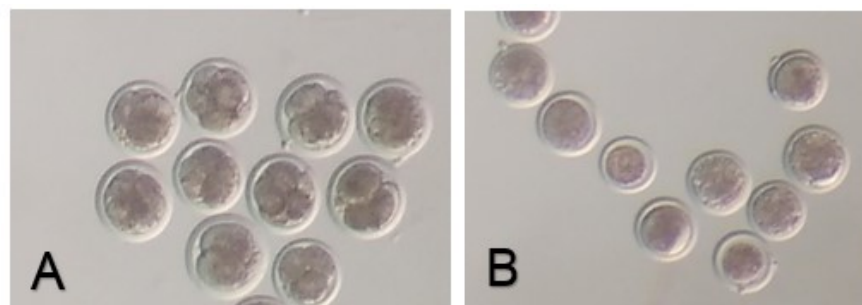
Momento de avaliação	Motilidade (%)	Vigor
Pré-Percoll	60	3
Pós-Percoll	80	4

Após o processo de seleção espermática, os oócitos maturados eram passados para a placa de fecundação com auxílio de uma micropipeta de vidro acoplada em um sistema de sucção. Cada grupo era transferido para um poço de uma placa Nunc® contendo 400 µl de meio TALP-Fert (composição conforme descrito acima) por poço. Após a passagem dos oócitos, era depositado 100 µl do conteúdo com espermatozoides preparado anteriormente. A placa era incubada em atmosfera controlada a 5% de CO<sub>2</sub> em ar, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C, por um período de 18 a 22 horas. Durante o estágio, foi realizada apenas uma rotina de FIV, com 120 oócitos fecundados.

### 2.1.3 Desnudamento e avaliação da clivagem

A etapa em que ocorre a remoção das células do *cumulus* é denominada de desnudamento e é realizada no terceiro dia da rotina (18-20 horas após a fecundação). O desnudamento era realizado por pipetagens sucessivas em meio suplementado com hialuronidase (1 mg/ml). Após o desnudamento, os zigotos eram transferidos para um fluido sintético do oviduto (meio SOF), onde permaneciam por 7 dias após a FIV para que pudessem se desenvolver até o estágio de blastocisto. O meio SOF era preparado conforme descrito previamente por Holm et al. (1999).

Durante o desenvolvimento embrionário, é necessário que a atmosfera seja controlada para apenas 5% de O<sub>2</sub>, visando mimetizar a tensão de oxigênio do oviduto e do útero (VAN SOOM & BOERJAN, 2002). Por isso, após o desnudamento os zigotos eram transferidos para uma placa Nunc<sup>®</sup> contendo meio SOF e colocados em uma câmara de acrílico, onde o ambiente era controlado com imersão de gases para que ficassem com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C. Vinte e quatro horas após a realização do desnudamento era realizada a avaliação da clivagem (figura 5). Eram considerados clivados os embriões que apresentavam mais que duas células (figura 5A). As estruturas que não clivaram (figura 5B) eram retiradas do poço para que não prejudicassem o desenvolvimento embrionário. Após a avaliação da clivagem, a placa retornava para a incubada onde era mantida até a avaliação do desenvolvimento embrionário no dia 7 após a fecundação.

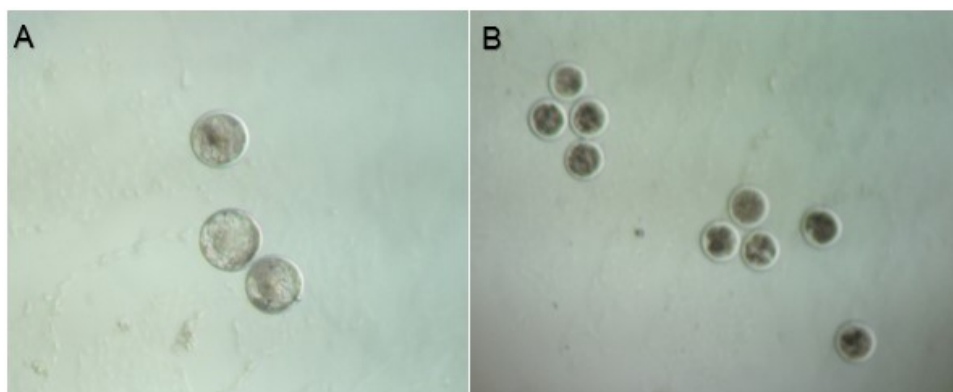


**Figura 5:** Avaliação de clivagem. **A)** Zigotos clivados. **B)** Não clivados. **Fonte:** Arquivo pessoal de João Ricardo Malheiros de Souza.

A figura 5 apresenta os zigotos clivados na rotina de embriões partenogenéticos, onde teve uma taxa de clivagem de 77,8%. Na rotina de FIV a média de clivagem foi de 29%. Nas rotinas de ICSI e clonagem, a avaliação da clivagem era realizada pelos pós-graduandos responsável pela rotina, tendo uma média de 60% de clivagem dos zigotos de ICSI e 70% da de clones. A rotina de FIV foi realizada para treinamento dos estagiários do BioRep, onde os mesmos eram responsáveis pela manipulação. Desta forma, a reduzida taxa de clivagem alcançada foi justificada pela manipulação inexperiente e demorada dos estagiários que a realizaram.

#### 2.1.4 Avaliação do desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário era avaliado sete dias após a fecundação *in vitro*. Os embriões eram classificados em mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido. A figura 6 apresenta as estruturas encontradas durante a avaliação do desenvolvimento embrionário da rotina de embriões partenogenéticos, a qual teve uma taxa de desenvolvimento de aproximadamente 36%.



**Figura 6:** Avaliação de Desenvolvimento Embrionário – D7. **A)** Embriões – Estádio de blastocisto expandido. **B)** Estruturas que não atingiram o estágio de blastocisto no D7 de cultivo. **Fonte:** arquivo pessoal.

Na rotina de FIV não foi avaliado o desenvolvimento embrionário, já que o intuito era apenas treinar os estagiários até o processo de fecundação *in vitro*. A taxa de desenvolvimento dos embriões ICSI e clone eram avaliadas pelos pós-graduandos a qual pertenciam as rotinas, tendo uma média de 15 a 20% nas rotinas de ICSI e 25 a 30% nas de clonagem.

### **2.1.5 Embriões partenogênicos**

Os embriões partenogênicos são aqueles desenvolvidos sem a contribuição do material genético paterno e podem ser obtidos *in vitro* através de inúmeras técnicas de estímulo químico, mecânico ou elétrico que vão levar a ativação do núcleo, mimetizando o efeito que o espermatozoide causaria (PAFFONI et al., 2008; HAFEZ et al., 2000). A prática de partenogênese era iniciada com a maturação de um grupo de oócitos bovinos (da mesma forma como descrito no item 2.1.1 desse relatório). A diferença em relação à PIVE ocorre no segundo dia de rotina, quando ao invés de serem fertilizados, os oócitos passavam por um processo de ativação logo após passar pela remoção das células do *cumulus*. No BioRep a ativação é feita utilizando-se ionomicina, seguida por um processo que permite a retenção do segundo corpúsculo polar, através do uso de 6-DMAP em concentração de 20 mM.

Para a ativação, apenas os oócitos maturados (apresentando a extrusão do 1º corpúsculo polar) e desnudos eram colocados na ionomicina (5 µM) durante 5 minutos, após esse tempo, eram lavados duas vezes em meio TCM-2 (composto por meio de maturação (descrito no item 2.1.1.3), 2 mg/ml de albumina sérica bovina, 100 IU/ml de penicilina e 50 µg/ml de sulfato de estreptomicina) e então, eram transferidos para o 6-DMAP, onde permaneciam por 4 horas para evitar a extrusão do segundo corpúsculo polar. Decorridas as 4 horas, eram realocados em uma placa Nunc® contendo meio SOF (conforme descrito por Holm et al., 1999) e submetidos à incubação em atmosfera controlada a 5% de CO<sub>2</sub> em ar, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C. No quarto dia após a ativação era avaliada a porcentagem de clivagem e no sétimo o desenvolvimento embrionário, seguindo os mesmos



princípios citados anteriormente (itens 2.1.3 e 2.1.4). Durante o período de estágio foi realizada apenas uma rotina de partenogênese com o intuito de treinamento da técnica, onde foram usados 18 oócitos maturados para a ativação, tendo uma taxa de clivagem de 77,8% e de desenvolvimento embrionário de 36%. Os blastocistos foram fixados em paraformaldeído a 4% durante 15 minutos e armazenados em solução de Triton 100x e PBS a 4 °C para posterior detecção de proteínas por imunofluorescência (conforme descrito no item 2.3.2).

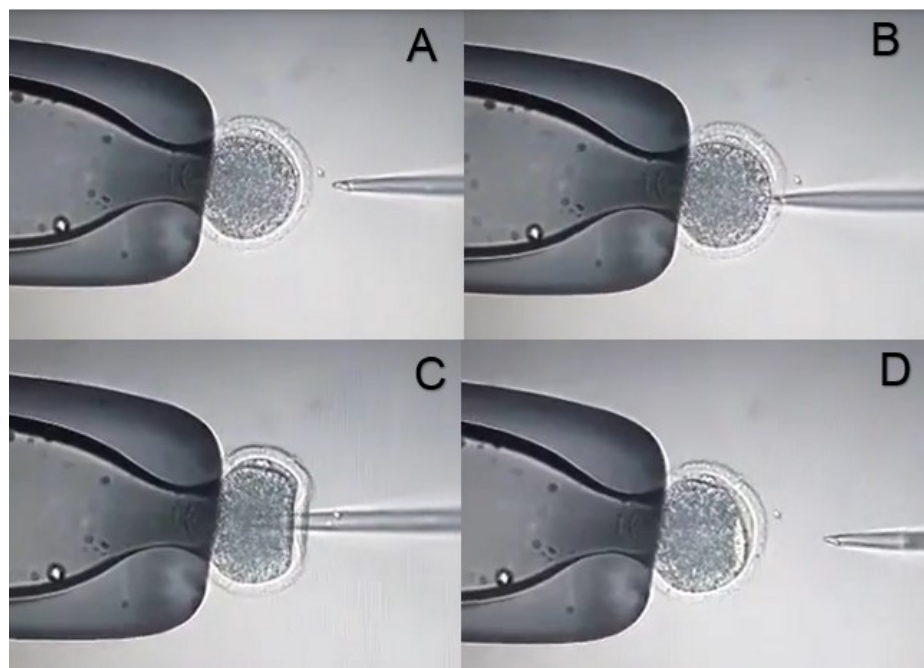
### **2.1.6 Embriões produzidos através da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides em oócitos**

A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) é uma técnica que consiste na injeção de um único espermatozoide dentro do citoplasma de um oócito maturado, utilizando um micromanipulador. Tem sido uma das principais soluções para reverter problemas de infertilidade decorrente de problemas com o macho em diversas espécies animais, bem como conseguir maiores taxas de descendentes usando sêmen sexado em bovinos (JO et al., 2014). Para a técnica de ICSI, oócitos eram maturados conforme citado anteriormente (item 2.1.1). No segundo dia de rotina, os espermatozoides eram selecionados através da técnica de *Percoll* (descrito no item 2.1.2) e realizada a remoção das células do *cumulus* dos oócitos. Com auxílio de um micromanipulador, oócitos maturados eram posicionados de modo que o corpúsculo polar ficasse na posição 6 ou 12 horas na pipeta de manutenção, enquanto que o espermatozoide era injetado pela pipeta de injeção no interior do citoplasma (figura 7) cuidadosamente para não lesionar a placa metafásica.

Após a injeção dos espermatozoides, os gametas eram ativados em ionomicina (5 µM) durante 5 minutos, lavados duas vezes no meio TCM-2 (composição conforme descrito no item 2.1.5), e então, submetidos a um dos tratamentos que o pós-graduando estava testando por 4 horas. Os tratamentos empregados nos experimentos eram: controle negativo (ionomicina), ativador da Proteína Kinase C,

inibidor da Ciclina dependente de Kinase 1 e a união entre os tratamentos (inibidor da Ciclina dependente de Kinase e ativador da Proteína Kinase C).

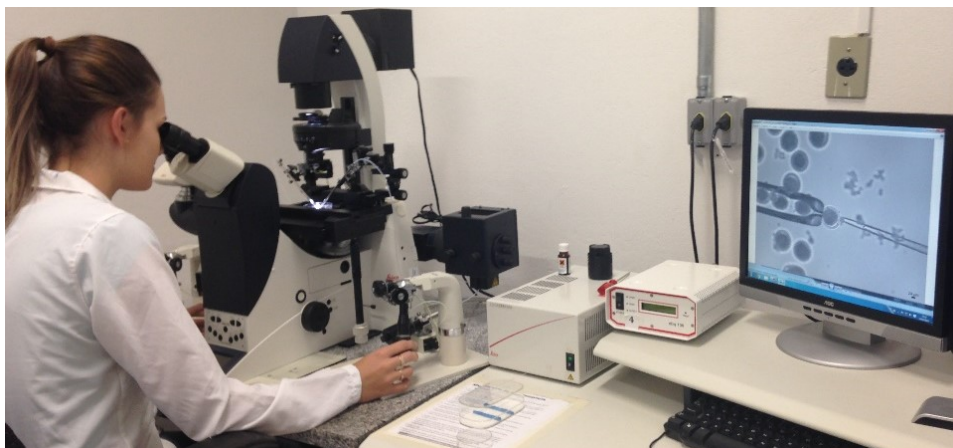
Após o período de tratamento, os gametas eram transferidos para uma placa com meio de cultivo (SOF; conforme descrito por Holm et al., 1999) e novamente incubados em estufa com atmosfera controlada a 5% de CO<sub>2</sub> em ar, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C. No segundo dia após a fecundação era avaliada a clivagem dos zigotos e no sétimo dia o desenvolvimento embrionário, seguindo os mesmos princípios citados anteriormente. As rotinas de ICSI acompanhadas durante o período de estágio resultam em aproximadamente 60% e as de blastocisto 15-20%. A ICSI foi uma técnica acompanhada durante o período de estágio, onde o pós-graduando responsável pela rotina realizava a prática e após o término da manipulação dos grupos experimentais, alguns oócitos eram disponibilizados para praticar a manipulação e descartados posteriormente.



**Figura 7:** Injeção intracitoplasmática de espermatozoides. **A)** Oócito maturado e desnudo. **B)** Injeção do espermatozoide pela pipeta de injeção no citoplasma do oócito. **C)** Deposição do espermatozoide no citoplasma do oócito. **D)** Oócito após a injeção. **Fonte:** arquivo pessoal.

### 2.1.7 Clonagem por transferência nuclear

A produção de clones por transferência nuclear consiste na reconstituição de um oócito em metáfase II, removendo o material genético e substituindo-o por uma célula somática que contenha o material genético de interesse (CAMPBELL et al., 2001). A rotina de clonagem é bastante semelhante com a rotina de ICSI, diferenciando-se principalmente no momento da micromanipulação, ao contrário de injetar um espermatozoide, parte do citoplasma contendo a metáfase II era removida e injetada uma célula somática que era cultivada anteriormente ao dia da rotina, conforme descrito no item 2.2.3 desse trabalho. Após a manipulação de todos os oócitos, eles eram fusionados por eletrofusão e ativados quimicamente em ionomicina (5  $\mu$ M), lavados duas vezes em TCM-199<sup>®</sup> e mantidos por 4 horas em meio SOF suplementado com 6-DMAP. Decorrido esse tempo, eram colocados para cultivo nas mesmas condições descritas para a PIVE. No segundo dia após a ativação era avaliada a clivagem dos zigotos e no sétimo dia o desenvolvimento embrionário, seguindo os mesmos princípios citados anteriormente. A clonagem foi uma técnica acompanhada durante o período de estágio, onde o pós-graduando responsável pela rotina realizava a prática e após o término da manipulação dos grupos experimentais, alguns oócitos eram disponibilizados para praticar a manipulação e descartados posteriormente (figura 8).



**Figura 8:** Equipamentos de micromanipulação. **Fonte:** arquivo pessoal.

## 2.2 CULTIVO DE CÉLULAS PRIMÁRIAS

O cultivo de células primárias é realizado para estudar o comportamento da célula de interesse quanto às suas características morfológicas e fisiológicas. Ele é obtido através do crescimento de células *in vitro* provenientes de um fragmento de tecido que foi submetido a procedimentos mecânicos e enzimáticos para a separação unitária das células que serão colocadas em placas de cultivo em condições específicas para o seu crescimento (ALVES et al., 2010).

### 2.2.1 Cultivo de células do corpo lúteo

O cultivo de células do corpo lúteo teve como objetivo estudar os mecanismos iniciais envolvidos no reconhecimento materno da gestação. O procedimento consistia na obtenção de ovários no abatedouro, os quais eram transportados até o laboratório em solução fisiológica a 28-32 °C. Como o intuito era estudar o início da fase progesterônica do ciclo estral e a viabilidade das células luteais iniciais, eram coletados apenas corpos lúteos de coloração vermelho-alaranjado. Cada ovário era manipulado individualmente, onde o corpo lúteo era dissecado do ovário e eram feitos alguns cortes a fim de obter a parte mais interna do corpo lúteo. Os pedaços de corpo lúteo eram lavados em PBS e então macerados com auxílio de um bisturi. O macerado de corpo lúteo era submetido a digestão enzimática com colagenase 1%. O meio contendo as células era semeado em uma placa de Petri e adicionado 5 ml de meio de DMEM 10%, totalizando um volume de 6 ml por placa. A placa era levada para a estufa de cultivo celular a 37 °C e a cada dois dias o meio era trocado. Em rotinas destinadas aos experimentos utiliza-se placas de 96 poços e uma concentração de 30.000 células por poço. Porém, as rotinas realizadas durante o estágio tinham o objetivo de treinamento da técnica e por isso as células foram semeadas sem uma concentração definida em placas de 60 mm.

Para a troca do meio da placa, todo o meio de cultivo era removido, a placa era lavada com solução de PBS aquecida. Após a remoção do PBS, era acrescentado 5 ml de DMEM 10% na placa e colocada em estufa de cultivo a 37 °C. O meio removido era guardado como amostra para estudos posteriores de biologia molecular e concentração hormonal.

### **2.2.2 Cultivo de células da granulosa**

O cultivo de células da granulosa é utilizado para estudos de mecanismos fisiológicos envolvidos nos processos de crescimento, seleção, ovulação e regressão folicular, bem como, a interação das células da granulosa com o oócito.

As células da granulosa foram obtidas de ovários provenientes de abatedouro e transportados ao laboratório em solução fisiológica a 28-32 °C. O par de ovários de um mesmo animal foi amarrado e condicionado na garrafa térmica de transporte. As células da granulosa foram coletadas do maior folículo encontrado em cada par de ovários, que estivesse entre 5 a 10 mm de diâmetro, e o mesmo deveria ser oriundo de pares de ovários que apresentassem um corpo lúteo hemorrágico, já que o objetivo era estudar folículos em fase de divergência folicular. A coleta era realizada em pares, já que eventualmente o folículo em divergência não se encontrava no mesmo ovário que o corpo lúteo hemorrágico.

A coleta das células foliculares foi realizada com auxílio de uma seringa de 1 ml, onde uma agulha 25x8 mm que estava acoplada à seringa entrava pela cortical do ovário até atingir o folículo em divergência e então, o líquido folicular era puncionado. Sem mexer com a agulha, a seringa era removida e o líquido folicular descartado. Então, era puxado na seringa o meio de lavagem (DMEM suplementado com 1 mg/ml de albumina sérica bovina, 1 µl/ml de anfotericina, 100 IU/ml de penicilina e 50 mg/ml de sulfato de estreptomicina) no mesmo volume que foi coletado de líquido folicular naquele folículo. A seringa era novamente acoplada na agulha e era realizado movimentos contínuos e consistentes de interposição de meio para dentro do folículo, denominado de *flushing*. Ao final, o meio contendo as células da granulosa era

depositado em um tubo de 15 ml. O *flushing* era repetido uma vez, já que tinha como objetivo a liberação das células da granulosa da parede do folículo e a obtenção do maior número delas.

Após a coleta das células foliculares, era realizada a contagem através da técnica de coloração por azul de Tripiano em Câmara de Neubauer. Eram contadas as células viáveis (células de aspecto brilhante sem coloração azulada no seu citoplasma, indicando que o corante não penetrou na célula) e as não viáveis (de coloração azul opaca, onde o corante foi capaz de penetrar na membrana celular) e realizado o cálculo de porcentagem de células viáveis. Para a amostra ser utilizada, ela deveria conter mais que 50% de células viáveis. Então, era feito um *pool* com as amostras viáveis, acrescentado meio de lavagem até completar aproximadamente 12 ml de conteúdo no tubo de 15 ml, centrifugado a 200 g por 10 minutos a 24 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante era removido e acrescentado meio de lavagem até completar 12 ml. Novamente era centrifugado a 200 g por 5 minutos a 24 °C, removido o sobrenadante, acrescentado 2 ml de meio de cultivo sem FSH (DMEM, 10 ng/μl de insulina, 1 mg/ml de albumina sérica bovina, 1 μl/ml de anfotericina, 1 μl/ml de androstenediona, 2,5 μg/ml de transferrina humana, 4 ng/ml de selenito de sódio, 100 IU/ml de penicilina e 50 μg/ml de sulfato de estreptomicina) e filtrado o conteúdo com um filtro de 0,22 μm.

Após o conteúdo ser filtrado, era realizada uma nova contagem das células com azul de Tripiano. Eram contados 2 quadrados com 16 quadrantes cada, feito a média entre eles, e colocados na fórmula:  $n^{\circ}$  de células = n (média dos dois quadrados) x 50.000. Onde o resultado era a quantidade de células em 1.000 μl de meio. Como o objetivo era semear cada poço com 500.000 células, era realizada uma regra de três para saber quantos μl do *pool* iriam ser semeados por poço.

As células eram semeadas em placa de 24 poços, onde o volume final deveria ser de 1 ml/poço. Assim, o volume que faltava para completar 1 ml, era acrescentado de meio de cultivo com FSH (DMEM, 10 μl/ml de FSH, 10 ng/μl de insulina, 1 mg/ml de albumina sérica bovina, 1 μl/ml de anfotericina, 1 μl/ml de androstenediona, 2,5 μg/ml de transferrina humana, 4 ng/ml de selenito de sódio, 100 IU/ml de penicilina e 50 mg/ml de sulfato de estreptomicina). A placa era colocada na estufa a 37 °C, onde permanecia por 24 horas. Completada as 24 horas de cultivo, as células eram

avaliadas em microscópio invertido quanto à sua morfologia, que deveriam ser arredondadas (células alongadas indicam luteinização). Então, as mesmas eram coletadas com TRIzol® para posterior extração de RNA, cDNA e avaliação da expressão gênica relacionada à esteroidogênese (aromatase e 3BHSD).

Durante o período de estágio, foram realizados apenas dois cultivos de células da granulosa, como projeto piloto para testar o cultivo com FSH e sem FSH. Nas duas rotinas, a avaliação após as 24 horas de cultivo foi satisfatória, apresentando morfologia celular ideal, ou seja, células arredondadas. As amostras foram coletadas em TRIzol® para posterior avaliação gênica conforme descrito a cima.

### **2.2.3 Cultivo de fibroblastos para clonagem**

As linhagens usadas nas rotinas de clonagem eram provenientes de cultivos primários de fibroblastos fetais da epiderme de bovinos coletados em frigorífico previamente estabelecidos e guardados em botijão de nitrogênio líquido. Aproximadamente 4 dias antes do uso dos fibroblastos para a rotina, um microtubo contendo as células era descongelado em banho-maria a 37 °C. Após descongelado, o microtubo era submetido a um *spin* de aproximadamente 1 minuto na centrífuga. O sobrenadante era removido e acrescentado 1 ml de meio DMEM 10%. Com pipetagens gentis, o *pellet* era desfeito e o conteúdo semeado em uma placa de 60 mm. Era acrescentado na placa mais 5 ml de DMEM 10% e submetida à estufa a 37 °C com o intuito das células se aderirem ao fundo da placa e se multiplicarem formando um “tapete” de células.

No dia de uso das células, elas eram analisadas em microscópio invertido quanto ao desenvolvimento (formação do tapete) e contaminação. Então, todo o meio da placa era removido, acrescentado 2 ml de tripsina e armazenando a placa na estufa a 37 °C por 5 minutos para ocorrer a reação enzimática, fazendo com que as células se soltassem do fundo da placa. Após decorridos os 5 minutos, era acrescentado 2 ml de meio DMEM 10% para inativar a tripsina e então, o conteúdo era disposto em 2 microtubos de 1,5 ml que eram submetidos a um *spin* na centrífuga. O sobrenadante

era removido e acrescentado 1 ml de DMEM 10% no microtubo. Nesse momento, os microtubos que não eram necessários para a rotina de clonagem eram novamente congelados em botijão de nitrogênio líquido. O microtubo que seria usado, era deixado na estufa até o momento da manipulação.

## 2.3 BIOLOGIA MOLECULAR

A biologia molecular é uma área de estudo que investiga o objeto de interesse a nível celular, buscando desvendar sua estrutura, material genético e expressão das informações moleculares através das proteínas (SCHAEFER, 2006). As técnicas de estudo molecular são amplamente utilizadas no meio científico como uma ferramenta para auxiliar a desvendar mecanismos celulares envolvidos no controle fisiológico do tecido estudado, através da expressão de genes chaves. As técnicas de biologia molecular acompanhadas no estágio serão descritas nos próximos itens.

### 2.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo Real

A reação em cadeia da polimerase em tempo Real (qRT-PCR) é uma técnica de biologia molecular, que consiste na amplificação do DNA complementar (cDNA) sintetizado pela reação de transcrição reversa *in vitro*, a partir de uma sequência iniciadora (*primer*) que indicará qual o gene de interesse que deve ser amplificado para ser quantificado, mostrando se ele é mais ou menos expresso no tecido alvo de estudo (ZAHA et al., 2012). Para chegarmos no produto final que é o resultado de expressão de mRNA dos genes de interesse, várias etapas são necessárias, e elas serão descritas a seguir.



### 2.3.1.1 Extração e quantificação de RNA.

A extração ou isolamento do RNA, mediante à lise das células de interesse, é o passo inicial para a avaliação da expressão de RNA utilizando a reação em cadeia da polimerase. A extração pode ser realizada através de diferentes protocolos e no BioRep a extração de RNA é realizada através de 3 técnicas: coluna, TRIzol® e mini TRIzol®.

A técnica de extração por coluna é a mais cara e a mais eficiente para recuperar o RNA total de amostras com menos de 10 células, onde precisa ter maior precisão da extração do material genético. Por ter um custo maior, no BioRep, só é usada em casos onde a amostra a ser extraída tem pouca quantidade de células, a qual não seria possível obter material genético suficiente através da técnica de TRIzol®. A extração por coluna foi realizada em 5 blastocistos clonados seguindo o protocolo do fabricante para ARCTURUS® PicoPure® RNA Isolation Kit. O RNA obtido não foi quantificado após a extração e foi mantido em *freezer* -80 °C até o momento do seu uso.

A técnica de TRIzol® ou Tiocianato de Guanidina-Fenol-Clorofórmio parte do princípio de isolar o RNA através da lise e desnaturação das células, fazendo com que ela libere os ácidos nucleicos que são separados em fases durante os procedimentos da técnica e apenas o RNA é recuperado e guardado para uso posterior. Esse método foi usado, conforme as recomendações do fabricante, para a extração de tecidos que continham maior quantidade de células, entre eles: amostras de sangue, hipófise de Jundiá (*Rhamdia quelen*) e adrenal de camundongo. Em cada procedimento de extração eram utilizados aproximadamente 50 a 100 mg de tecido macerado com TRIzol®. Ao final do procedimento de extração o *pellet* contendo RNA era eluído em 20 µl de água Milli-Q e armazenado em freezer -80 °C. A tabela 7 apresenta a quantidade de amostras extraídas de cada tecido que foram acompanhadas durante o período de estágio, bem como a média de RNA ao final da extração.

**Tabela 7:** Quantidade de amostras extraídas através da técnica de TRIzol®, bem como a média de RNA quantificado após a extração.

Tecido Extraído	Quantidade*	RNA**	A260/280***
Adrenal de camundongo	12	550 ng/μl	1.80
Hipófise de Jundiá	30	100 ng/μl	1.82
Sangue (neutrófilos)	22	300 ng/μl	1.71

\*Quantidade de amostras extraídas de cada tipo de tecido.

\*\*Média de RNA das amostras obtida após a extração.

\*\*\*Média de pureza (relação 260/280) da amostra apresentada pelo Nanodrop®.

A extração de RNA utilizando a técnica de mini TRIzol® foi adaptada pelo BioRep para a extração de RNA de amostras com poucas células, já que nesses casos é mais eficiente que a técnica de TRIzol® convencional descrita anteriormente. O procedimento e o princípio são bastante semelhantes à técnica de TRIzol® convencional, mudando apenas os volumes dos reagentes utilizados. Foram realizadas duas extrações, tendo como amostra células da granulosa de um doutorando da Universidade Federal de Pelotas. A média de RNA obtida na extração de células da granulosa foi de 200 ng/μl, com uma pureza de 1.78.

Após a extração do RNA, o próximo passo era a quantificação da amostra através de espectrofotometria. Essa etapa era feita somente no dia em que o RNA seria usado para a transcrição reversa. Era pipetado 1 μl da amostra no local de leitura do aparelho de espectrofotometria e selecionada a opção de mensuração. O programa mostrava quantos ng de RNA tinha por μL da amostra, a razão 260/280 e a razão 230/260. A quantidade de RNA de cada amostra é algo bastante relativo e depende de vários fatores, como por exemplo, a manipulação e o tamanho do tecido extraído. Já a razão 260/280 indica a pureza da amostra, ou seja, se houve contaminação com DNA e proteína no momento da extração. E a razão 230/260 indica se houve contaminação química da amostra. O ideal é que a razão 260/280 esteja entre 1.8 e 2.0, e a 230/260 perto de 2.0. A quantificação é uma etapa importante da biologia molecular, já que através dela se torna possível equiparar a quantidade de RNA das diferentes amostras para posteriormente fazer o cDNA com a mesma quantidade de RNA para todos os tratamentos e possibilitar uma comparação correta de expressão dos genes de interesse.

### 2.3.1.2 Transcrição Reversa (cDNA)

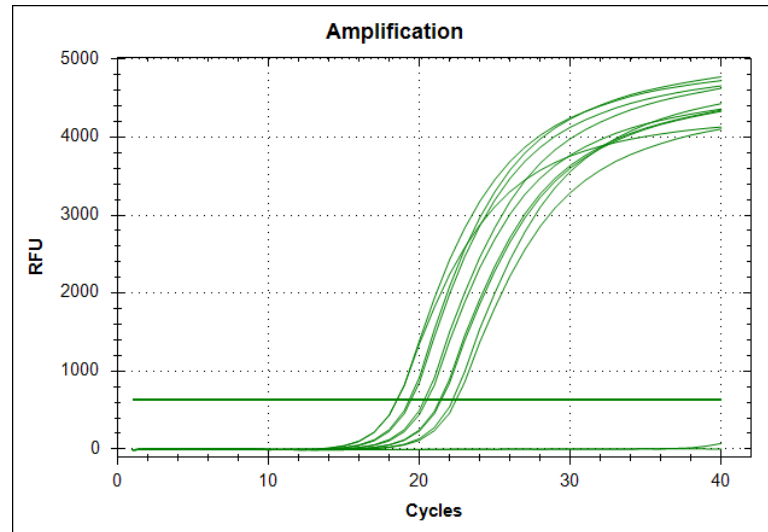
Após a quantificação, era necessário decidir qual concentração de RNA que iríamos usar como *template* para produzir o cDNA, geralmente era utilizado de 300 a 500 ng em 20 µl de volume final. A transcrição reversa realiza um processo reverso ao que acontece normalmente na célula, ou seja, ao invés do DNA dar origem ao RNA, o mRNA vai dar origem a fita de cDNA, tornando possível à amplificação no PCR. A transcrição reversa depende da enzima DNA-polimerase RNA-dependente, ou Transcriptase Reversa, que produz DNA a partir de um molde de RNA (LADEIRA et al., 2011) associada a ciclos de temperatura que são controlados por um termociclador.

Durante o estágio foram realizadas 6 reações de transcrição reversa com amostras de blastocistos, adrenal de camundongo, células da granulosa bovinas e hipófise de Jundiá. O primeiro passo foi a quantificação das amostras e o cálculo de quantos µl de cada uma que deveria ser pipetado para que todas elas tivessem 300 a 500 ng para a reação e em consequência, quantos µl de água deveria ser pipetado. Depois, era acrescentado a DNase e o *DNase-buffer* e colocado no termociclador por 15 minutos a 27 °C, nesse momento ocorre a lise de qualquer fita de DNA que pudesse ter contaminado a amostra. Ao final dos 15 minutos, era acrescentado 1 µl de EDTA e colocado no termociclador por 10 minutos a 65 °C com o intuito de inativar a DNase para que ela não viesse a degradar as fitas de cDNA que seriam formadas. Após decorrida a inativação da DNase, era acrescentada a Transcriptase Reversa e o *Mix* contendo os reagentes necessários para a construção da fita complementar (era utilizado o *iScript™ cDNA Synthesis Kit*, BioRad®) e colocados novamente no termociclador por 5 minutos a 25 °C e depois por mais 30 minutos a 42 °C. Ao final da reação, os cDNAs eram armazenadas em *freezer* -20 °C até o momento em que fossem utilizadas para a PCR.

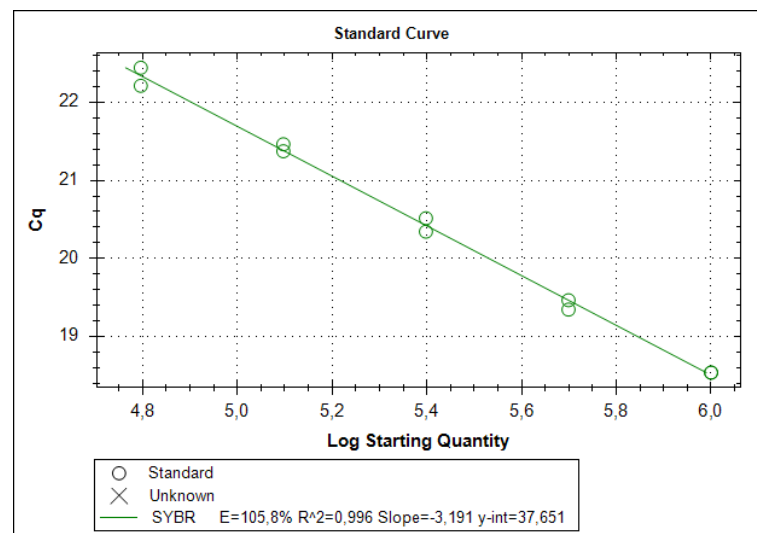
### 2.3.1.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A pipetagem das amostras de cDNA e do *master mix* para a placa de PCR era o último passo, que era realizado com bastante atenção, já que o volume colocado em cada poço era pequeno e poderia alterar o resultado. O *master mix* era preparado para cada amostra da seguinte forma: 1 µl de água nuclease *free*, 1 µl de primer *senso* e 1 µl de *primer anti-senso*. No *master mix* também era acrescentado 5 µl de *GoTaq® qPCR Master Mix* (que contém o *BRYT Green®*, substância fluorescente; e a enzima DNA polimerase), que é um marcador para a leitura pela a máquina de qRT-PCR, porém, pela instabilidade (é uma substância fotossensível e termossensível) desse marcador, ele era colocado após a pipetagem das amostras na placa. Após o preparo do *master mix*, era pipetado 2 µl da amostra de cDNA por poço da placa. Então, o *GoTaq®* era acrescentado no *master mix* e pipetado 8 µl sobre cada poço contendo as amostras, o volume final de cada poço deveria ser de 10 µl. A placa era fechada com um filme de vedação próprio para a reação e então, centrifugada para que o conteúdo descesse para o fundo dos poços. Após a centrifugação, a placa era levada para o termociclador de qRT-PCR (Bio-Rad CFX384 Touch™), o programa era selecionado e dado início à reação.

Durante o período de estágio foram acompanhadas cinco reações em cadeia da polimerase, todas elas com o intuito de validação de *primers* para o experimento com Jundiá de uma doutoranda do laboratório de fisiologia da UFSM, que tem parceria com o BioRep para a realização de técnicas de biologia molecular. Os genes submetidos ao PCR eram genes de referência (*housekeeping*), entre eles: ACTB, RPL13 e UBQ. Foi realizada também a curva padrão da ACTB e da UBQ. A curva padrão é importante para saber se a reação do *primer* é eficiente, ou seja, durante a fase logarítmica da reação, o produto de PCR de interesse amplificado em um aumento constante de amplicon em cada ciclo. Para fazê-la, pegamos 1 µl de cada amostra do experimento e montamos um *pool*. Do *pool*, foi realizada diluições seriadas para 5 pontos da curva. E então, pipetada a placa da mesma forma como descrito anteriormente. No final da reação, era analisada a curva de amplificação (figura 9), a curva padrão (figura 10) e a curva de dissociação (figura 11) através do *Software* da BioRad.

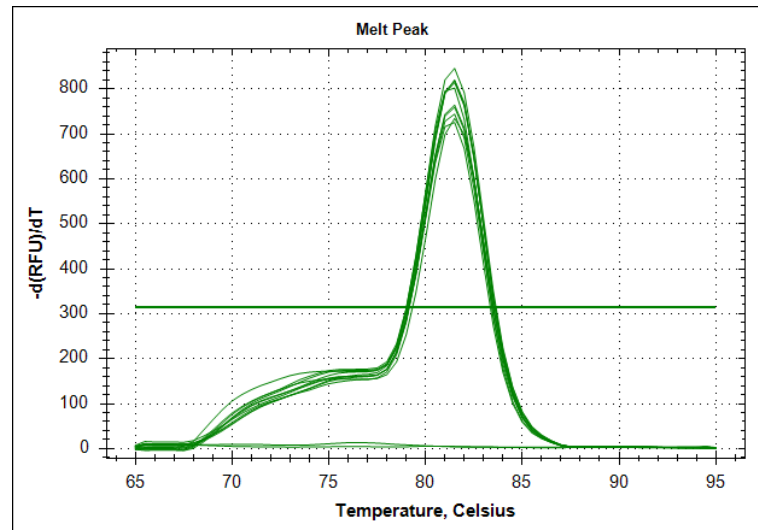


**Figura 9:** Curva de amplificação da ACTB. A curva de amplificação indica em qual ciclo teve início a fase exponencial, ou seja, quando teve expressão suficiente para que o fluoróforo utilizado fosse capaz de emitir sinal detectável pelo termociclador. Quando se analisa uma curva de amplificação em teste de *primer*, o objetivo é avaliar se as curvas das duplicatas estão uma sobre a outra e se o espaço entre os pontos da curva é semelhante, indicando que teve uma boa pipetagem pelo manipulador. Essa curva mostra que o manipulador foi eficiente ao pipetar a curva da ACTB. Dependendo do valor do ciclo (Cq), sabe-se o nível de expressão do gene de interesse, sendo que menores (Cq) significam maior expressão, e vice-versa. **Fonte:** arquivo pessoal.



**Figura 10:** Curva padrão da ACTB. A curva padrão serve para determinar a eficiência do primer em amplificar o gene em função da célula ou tecido de estudo, e também, por ser feita sobre um *pool* de amostras em diluição em série, serve para determinar a diluição que será usada nas reações finais. Cada ponto da curva foi pipetado em duplicata para correção de erro de pipetagem. Quanto mais em

cima da linha da curva os pontos estiverem, mais eficiente é a curva. O programa calcula a eficiência da curva, sendo que para ser considerada uma curva eficiente, o “E” deve estar entre 85 e 110%. Nesse caso, o *primer* para ACTB foi considerado eficiente (E= 105,8%). **Fonte:** arquivo pessoal.



**Figura 11:** Curva de dissociação da ACTB. A curva de dissociação indica a especificidade do *primer*. Ela determina em qual temperatura ocorreu a dissociação das fitas de cDNA. É importante que a água (amostra negativa) não demonstre pico na curva de dissociação, caso contrário indica formação de dímeros ou contaminação. Para ser considerado um *primer* específico, todas as amostras devem se dissociar na mesma temperatura, formando um pico único. A curva de dissociação mostra que o *primer* da ACTB é específico. **Fonte:** arquivo pessoal.

### 2.3.2 Detecção de proteína por imunofluorescência

A imunofluorescência é uma técnica qualitativa de detecção de proteína nas células. Ela é baseada em uma reação entre antígeno e anticorpo para detectar e caracterizar as moléculas de interesse (FERRO, 2013). Essa técnica foi realizada primeiramente em zigotos obtidos 48 horas após a fertilização *in vitro* e tratados por 24 horas com FGF18 com o intuito de detectar a presença da proteína H2A.x Ser139ph que é uma forma fosforilada da Serina 139 da histona 2A.x, indicando se houve quebra da dupla fita do DNA decorrente do tratamento. As imagens geradas

nessa rotina foram enviadas para o Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Catarina para serem analisadas.

A técnica de imunofluorescência foi também utilizada nos blastocistos partenogênicos da rotina descrita no item 2.1.5 desse relatório, com o intuito de praticar a técnica. Nesse caso, foram utilizados anticorpos para detecção das proteínas Oct-4 e CDX2. O primeiro é relacionado com a pluripotência e o segundo com a competência e implantação embrionária. Porém, durante o procedimento a diluição dos anticorpos foi realizada de forma equivocada e ao final, não ocorreu marcação, não tendo como analisar e apresentar resultados. A imunofluorescência consiste na incubação *overnight* dos embriões com um anticorpo primário, que não deve ser da mesma espécie animal que o tecido de estudo, que vai se ligar a epítomos do embrião. E uma posterior incubação com um anticorpo secundário anti a espécie do primário. Após a interação antígeno-anticorpos, os tecidos passaram por um processo de coloração com o fluoróforo Dapi que marca o núcleo e então, foram submetidos à microscopia de fluorescência para a avaliação da presença ou ausência das proteínas de interesse. A figura 12 apresenta a marcação e presença da proteína H2A.x Ser139ph em um dos zigotos que passaram pela técnica de imunofluorescência.



**Figura 12:** Embrião submetido à técnica de imunofluorescência para a detecção da proteína H2AX. Nas regiões com marcação fluorescente é considerada a presença da proteína de interesse. O que está marcado em azul é DAPI. **Fonte:** arquivo pessoal.

Para a conservação dos embriões até o momento da realização da imunofluorescência, eles devem ser fixados em paraformoldeído a 4% durante 15 minutos e armazenados em solução de Triton 100x e PBS a 4 °C.

### 3 CONCLUSÃO

O estágio curricular supervisionado é uma etapa fundamental da graduação, onde o aluno tem a oportunidade de vivenciar a área profissional de escolha de maneira intensa, dinâmica e completa.

Durante o período de estágio foi possível aplicar técnicas e conhecimentos já conhecidos durante a graduação e a iniciação científica, mas também, proporcionou o aprendizado de novas técnicas mais laboriosas e a aplicação da biologia molecular, onde foi possível perceber a importância dessas práticas tanto no aspecto científico, quanto econômico e comercial.

As diferentes técnicas acompanhadas, a vivência em um laboratório de excelência em um local acadêmico, a participação em apresentações de conclusão de curso de pós-graduação e a vida em uma cidade diferente, tornam-se uma preparação para a vida profissional.



#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. A. & GUIMARÃES, A. C. R. **Cultivo celular**. 2. 5 ed. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2010.

CAMPBELL, K. H. S.; ALBERIO, R.; LEE, J. H.; et al. **Nuclear Transfer in Practice**. Cloning and Stem Cells 3. 4 ed. 2001.

FERRO A. B. **Imunohistoquímica**. Lisboa: Instituto Politécnico de Lisboa, 2013.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. & FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2014.

HAFEZ, E. S. E. & HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. Philadelphia, 2000. P. 68-82.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; et al. **High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins**. Theriogenology 52. Elsevier, 1999. P. 683-700.

JO, H. T.; BANG, J. I.; KIM, S. S.; et al. **Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: Efficiency and in vitro developmental competence**. Theriogenology 81, 2014. P. 675-682.

LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C. & FERREIRA, M. C. **Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real**. Rev Med. São Paulo, 2011. P. 47-51.

LEIBFRIED, L. & FIRST, N. L. **Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature In Vitro**. Journal of Animal Science. Vol. 48. Madison, 1979.

OLIVEIRA, O. N. **Research Landscape in Brazil: Challenges and Opportunities**. J. Phys. Chem. C., 2016. P. 5273-5276.

PAFFONI, A.; BREVINI, T. A. L.; GANDOLFI, F.; et al. **Parthrogenetic Activation: Biology and Applications in the ART Laboratory**. Placenta. Vol. 29. Milan, Italy, 2008. P. S121 - S125.

SCHAEFER, R. **Técnicas em Biologia Molecular**. Embrapa Suínos e Aves. Concórdia, 2006.

VAN SOOM, A.; & BOERJAN, M. **Assessment of Mammalian Embryo Quality**. Merelbeke, Belgium, 2002.

VISINTIN, J. A.; MELLO, M. R. B.; MILAZZOTTO, M. P. et al. **Bioteecnologias da reprodução animal - Clonagem e transgenia animal**. Ciênc. vet. tróp. Recife, 2008. P. 139-144.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. & PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.