

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Gislaine dos Santos

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO NA ÁREA DE
BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO ANIMAL**

Curitibanos

2021

Gislaine dos Santos

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO NA ÁREA DE
BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO ANIMAL**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais da
Universidade Federal de Santa Catarina como requisito
para a obtenção do título de Médica Veterinária.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta

Curitiba

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Gislaine

Relatório de estágio curricular obrigatório na área de Biotecnologia da Reprodução Animal / Gislaine Santos ; orientador, Marcos Henrique Barreta, 2021.

36 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Graduação em Medicina Veterinária, Curitibanos, 2021.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária. 2. cultivo celular. 3. PIVE. 4. IF. 5. qPCR. I. Henrique Barreta, Marcos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

Gislaine dos Santos

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO NA ÁREA DE
BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO ANIMAL**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharelado em Medicina Veterinária aprovado em sua forma final pela seguinte banca:

Curitiba, 14 de maio de 2021.

Prof. Dr. Malcon Andrei Martinez Pereira
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

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

M.V André Lucio Fontana Goetten
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Vitor Braga Rissi
Avaliador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

RESUMO

O estágio curricular obrigatório é um componente importante nos cursos de graduação em Medicina Veterinária e estabelece uma ligação entre a teoria apreendida durante a graduação e a prática. Esse relatório trata-se de uma experiência vivenciada em um laboratório de pesquisa científica na área de biotecnologia da reprodução animal. Como local de estágio optou-se pelo Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS). Durante o estágio foi possível treinar as técnicas de produção *in vitro* de embriões, cultivo de células primárias (células da granulosa e teca) e técnicas de biologia molecular, como a imunofluorescência (IF) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). O estágio curricular supervisionado foi realizado sob supervisão do professor Doutor Valério Valdetar Marques Portela Junior e orientação do professor Doutor Marcos Henrique Barreta, entre os dias 01 de fevereiro a 30 de abril de 2021, perfazendo um total de 480 horas.

Palavras-chave: cultivo celular, PIVE, IF, qPCR

ABSTRACT

The curricular internship is an important component in undergraduate Veterinary Medicine courses and establishes a link between the theory learned during graduation and the practice. This report is an experience lived in a scientific research laboratory in the biotechnology of animal reproduction area. As an internship location, the Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep) at the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS) was chosen. During the internship was possible to train the techniques of in vitro production of embryos, primary cells cultures (granulosa and theca cells) and molecular biology techniques, such as immunofluorescence (IF) and polymerase chain reaction in real time (qRT-PCR). The internship was supervised by Professor Valério Valdetar Marques Portela Junior and had as advisor Professor Marcos Henrique Barreta, between February 1st and April 30th, 2021, for a total of 480 hours.

Keywords: cell culture, IVPE, IF, qPCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fachada do BioRep, UFSM, campus Santa Maria (RS).	17
Figura 2 – Sala de microscopia do BioRep. A sala conta com um estereoscópio para realização de imunofluorescência, microscópio de fluorescência e microscópio dissecador a laser.	18
Figura 3 – Sala de cultivo celular e de produção in vitro de embriões do BioRep.	18
Figura 4 – Sala de biologia molecular do BioRep.....	19
Figura 5 – Células da granulosa em Câmara de Neubauer (aumento de 200x). Células viáveis (seta preta) e células não viáveis (seta azul). Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (BioRep).	23
Figura 6 – Visualização da placa de petri contendo líquido folicular e CCOs bovinos (seta) em estereomicroscópio.	25
Figura 7 – Observação de CCOs bovinos expandidos após 18 horas de maturação.	26
Figura 8 – Avaliação do desenvolvimento embrionário no dia 7 do cultivo.....	28
Figura 9 – Curva padrão de RT-PCR tempo real. Diluição em série (duplicata) das amostras de cDNA obtido de células da granulosa. O valor de eficiência do primer para CTGF está dentro do esperado ($E=103,8\%$). Para correção dos erros de pipetagem, cada diluição foi.....	34
Figura 10– Curva de dissociação do CTGF. Determina em qual temperatura houve a dissociação das fitas de cDNA.....	34
Figura 11 – Curva de amplificação do CTGF indicando em qual ciclo iniciou a fase exponencial.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rotinas acompanhadas no BioRep, durante a realização do Estágio Curricular Obrigatório em Medicina Veterinária.....	20
Tabela 2 – Detalhamento das rotinas de biologia molecular acompanhadas no BioRep, durante a realização do Estágio Curricular Obrigatório em Medicina Veterinária.	20
Tabela 3 – Detalhamento das rotinas das demais atividades acompanhadas no BioRep, durante a realização do Estágio Curricular Obrigatório em Medicina Veterinária.	21
Tabela 4 – Número total de embriões avaliados durante o período de estágio.	28
Tabela 5 – Rotinas de imunofluorescência e número de amostras acompanhadas.	30
Tabela 6 - Rotinas de extração de RNA e número de amostras acompanhadas durante o período de estágio.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-DMAP	6-dimethylaminopurine
BSA	Albumina sérica bovina
CCOs	Complexos cumulus oócitos
Cq	Valor de ciclo
FSH	Hormônio folículo estimulante
IF	Imunofluorescência
LH	Hormônio luteinizante
NaCl	Cloreto de sódio
PHE	Phenilalanine-Hipotaurine-Epinefrine
PIVE	Produção in vitro de embriões
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS	16
2	RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO	17
2.1	DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	17
2.2	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	19
2.2.1	Cultivo de células primárias	21
2.2.1.1	<i>Cultivo de células da granulosa</i>	<i>21</i>
2.2.1.1.1	Cultivo de células da granulosa de folículos ovarianos grandes	22
2.2.1.1.2	Cultivo de células da granulosa de folículos ovarianos pequenos.....	23
2.2.2	Produção in vitro de embriões bovinos.....	24
2.2.2.1	<i>Coleta dos ovários e aspiração folicular.....</i>	<i>24</i>
2.2.2.2	<i>Procura e seleção dos oócitos</i>	<i>24</i>
2.2.2.3	<i>Maturação dos oócitos</i>	<i>25</i>
2.2.2.4	<i>Fecundação in vitro.....</i>	<i>26</i>
2.2.2.5	<i>Desnudamento</i>	<i>27</i>
2.2.2.6	<i>Avaliação da clivagem e do desenvolvimento embrionário</i>	<i>27</i>
2.2.2.7	<i>Embriões partenogénéticos</i>	<i>28</i>
2.2.3	Biologia Molecular	29
2.2.3.1	<i>Imunofluorescência de embriões para detecção de proteína.....</i>	<i>29</i>
2.2.3.2	<i>Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real</i>	<i>31</i>
2.2.3.2.1	Extração de RNA.....	31
2.2.3.2.2	Quantificação de RNA.....	32
2.2.3.2.3	Transcrição reversa (cDNA).....	32
2.2.3.2.4	Reação em cadeia da Polimerase	33
3	CONCLUSÃO.....	36

REFERÊNCIAS.....	37
-------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo com cerca de 200 milhões de cabeças, composto em sua maior parte por raças zebuínas (MAPA). Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (Abiec), em 2019 o Brasil exportou 1,84 milhão de toneladas de carne bovina e obteve receita de US\$ 7,59 bilhões. Durante os últimos anos a pecuária sofreu um enorme crescimento devido ao aumento da população mundial e da demanda por proteína animal. Buscando atender a demanda interna, expandir as exportações e aumentar a receita, o Brasil está investindo em estudos de biotécnicas reprodutivas que visam melhorar a eficiência reprodutiva e o melhoramento genético animal (MUCARI et al., 2011).

Para a aplicação de bons resultados através das biotecnologias é imprescindível o controle e conhecimento dos processos reprodutivos. Atualmente, cientistas buscam esclarecer fatores que podem alavancar os índices reprodutivos e explorar animais de alto valor genético através da pesquisa científica. Já foram elucidados alguns aspectos que respondem perguntas encontradas na produção animal, geralmente relacionadas a fisiologia do macho e da fêmea, a atividade do embrião no reconhecimento e na manutenção da prenhez e as vulnerabilidades encontradas no desenvolvimento embrionário (GONÇALVES et al., 2014). Essas descobertas importantes, que levam a avanços nas biotécnicas reprodutivas, são realizadas em empresas comerciais e instituições de ensino e pesquisa. Nas instituições de ensino um grupo de pesquisa geralmente é composto por alunos de iniciação científica, estagiários, alunos de pós-graduação (mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos) e professores pesquisadores que possuem como objetivo ampliar a capacidade técnico-científica e responder as demandas da comunidade.

O Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep) localizado na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) é um exemplo de instituição de ensino responsável por contribuições reconhecidas mundialmente e que anualmente recebe diversos alunos para colaborar com novas descobertas. Com a finalidade de aprimorar os conhecimentos adquiridos durante a graduação, vivenciar situações reais e desenvolver atividades ligadas a Biotecnologia da Reprodução, o BioRep foi escolhido para realizar a disciplina de Estágio Curricular Obrigatório do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), campus de Curitibanos. A escolha do local foi motivada pela excelência em pesquisas que o laboratório realiza e pelo interesse pessoal na área científica, contribuindo dessa forma com a formação da discente.

1.1 OBJETIVOS

O presente relatório tem por objetivo descrever o local de estágio e relatar as principais atividades desenvolvidas com ênfase na produção *in vitro* de embriões, cultivo celular e biologia molecular, realizadas sob supervisão do Prof. Dr. Valério Valdetar Marques Portela Junior e orientação do professor Dr. Marcos Henrique Barreta.

2 RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO

2.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O BioRep (Figura 1) foi fundado em 1997 com o intuito de desenvolver pesquisa nas áreas da biotecnologia da reprodução e resolver problemas científicos básicos. O prédio está localizado no Parque de Exposições da UFSM, Rua Z, Prédio 63b em Camobi, Santa Maria – RS.

Figura 1 – Fachada do BioRep, UFSM, campus Santa Maria (RS).



Fonte: arquivo pessoal, 2021.

Atualmente o laboratório conta com 2 professores coordenadores (Alfredo Quites Antoniazzi e Valério Valdetar Marques Portela Junior), 1 pós-doutoranda, 9 doutorandos, 6 mestrandos, 4 alunos de iniciação científica e 1 técnico de laboratório. As principais linhas de pesquisa envolvem as áreas de biotécnicas aplicadas a reprodução animal (regulação e indução do estro em vacas de corte no anestro pós-parto; produção *in vitro* de embriões bovinos), fisiologia e patologia da reprodução animal (reconhecimento materno de gestação em ruminantes, regulação e controle do desenvolvimento folicular e ovulação em mamíferos; regulação do crescimento e maturação de oócitos bovinos).

O prédio do laboratório está dividido em três pavimentos. O térreo possui a recepção e o setor técnico que abrange as seguintes salas: 1) Microscopia (Figura 2); 2) Sala de cultivo celular (Figura 3); 3) Sala de recepção de ovários e punção folicular; 4) Sala de lavagem e

esterilização dos materiais; 5) Sala de reagentes e preparo de meios de cultivo; 6) Sala de biologia molecular (Figura 4); 7) Sala de tecnologia do sêmen; 8) Sala fria; 9) Sala da histologia; 10) Almojarifado.

Figura 2 – Sala de microscopia do BioRep. A sala conta com um estereoscópio para realização de imunofluorescência, microscópio de fluorescência e microscópio dissecador a laser.



Fonte: arquivo pessoal, 2021.

Figura 3 – Sala de cultivo celular e de produção in vitro de embriões do BioRep.



Fonte: arquivo pessoal, 2021.

Figura 4 – Sala de biologia molecular do BioRep.



Fonte: arquivo pessoal, 2021.

No segundo pavimento localiza-se a biblioteca, salas dos professores e sala dos estudantes da pós-graduação. O terceiro pavimento conta com um refeitório, um auditório e uma sala de aula.

2.2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O estágio curricular obrigatório foi realizado no período de 01 de fevereiro de 2021 a 30 de abril de 2021, totalizando 480 horas. A supervisão das atividades foi de responsabilidade do Prof. Dr. Valério Valdetar Marques Portela Junior.

Buscando facilitar a compreensão dos dados, o levantamento das atividades acompanhadas durante o estágio curricular será descrito na forma de figuras e tabelas divididos entre as técnicas de cultivo celular, produção *in vitro* de embriões bovinos, biologia molecular e outras atividades. A frequência (número de rotinas) que as atividades foram acompanhadas durante o período de estágio serão descritas de acordo com estes grupos de afinidade. De modo geral, foram acompanhadas 121 rotinas durante o período de estágio, sendo 77 rotinas de biologia molecular, 12 de cultivo celular, 9 de PIVE e 23 outras atividades como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Rotinas acompanhadas no BioRep, durante a realização do Estágio Curricular Obrigatório em Medicina Veterinária.

Atividades	Número
Biologia Molecular	77
Cultivo Celular de Granulosa Bovina	12
Produção <i>in vitro</i> de Embriões Bovinos	9
Outras atividades	23
Total	121

As atividades relacionadas a biologia molecular estão descritas na tabela 2. Foram acompanhadas 31 rotinas de imunofluorescência de embriões, 24 de RT-qPCR, 9 de extração de RNA por coluna, 7 de quantificação de RNA e 6 de transcrição reversa.

Tabela 2 – Detalhamento das rotinas de biologia molecular acompanhadas no BioRep, durante a realização do Estágio Curricular Obrigatório em Medicina Veterinária.

Atividades	Número
Imunofluorescência de embriões bovinos	31
RT-qPCR	24
Extração de RNA por coluna	9
Quantificação de RNA	7
Transcrição reversa	6
Total	77

Durante o período de estágio curricular foram acompanhadas 14 rotinas de cultivo celular, sendo 12 rotinas de cultivo de células da granulosa de folículos grandes (> 10 mm) e 2 cultivos de células da granulosa de folículos pequenos de bovinos (3-6 mm).

Foram acompanhadas 8 rotinas de produção *in vitro* de embriões (aspiração folicular; busca, seleção e maturação de oócitos; seleção espermática e fertilização; desnudamento; avaliação de desenvolvimento embrionário) e 1 rotina de produção de embriões partenogênicos. Além disso, outras atividades (Tabela 3) também foram acompanhadas durante o período de estágio, como a participação em defesas de mestrado e doutorado, qualificação de doutorado, preparo de soluções estoque e trabalho, coleta de ovários no frigorífico e a lavagem, esterilização e organização dos materiais do laboratório (diariamente).

Tabela 3 – Detalhamento das rotinas das demais atividades acompanhadas no BioRep, durante a realização do Estágio Curricular Obrigatório em Medicina Veterinária.

Atividades	Número
Participação em defesas de mestrado	3
Participação em defesas de doutorado	1
Participação em qualificação de doutorado	1
Preparo de soluções	15
Coleta de ovários no frigorífico	3
Total	23

2.2.1 Cultivo de células primárias

Em 1907, Ross Harrison descreveu a técnica de cultivo celular de fibras nervosas, que permitia manter as células viáveis fora do tecido original se tornando um modelo alternativo para a substituição dos animais em experimentos de pesquisa (HARRISON et al., 1907). Desde então essa técnica vêm sendo utilizada na pesquisa básica e aplicada, auxiliando a compreensão dos mecanismos das células e o funcionamento de um organismo ou tecido (FRESHNEY, 2005).

O cultivo celular é dividido em 3 categorias: 1) Cultivo de células primárias: são células que possuem tempo de sobrevivência determinado; 2) Cultivo de células estabelecidas: possuem alta proliferação e não perdem as características do tecido de origem e 3) Cultivo de células transformadas: características genéticas transformadas (VERTREES et al., 2008).

As células primárias possuem características genotípicas e fenotípicas iguais ao tecido original e mesmo com os nutrientes necessários seu crescimento celular acontece por um período de tempo curto devido um mecanismo de renovação tecidual (apoptose; ALVES; GUIMARÃES, 2010).

2.2.1.1 Cultivo de células da granulosa

No ambiente folicular o oócito é cercado por várias camadas de células da granulosa que se diferem em células do *cumulus oophorus* e células murais durante a fase final da foliculogênese. Além da proteção e nutrição para desenvolvimento dos oócitos, as células da

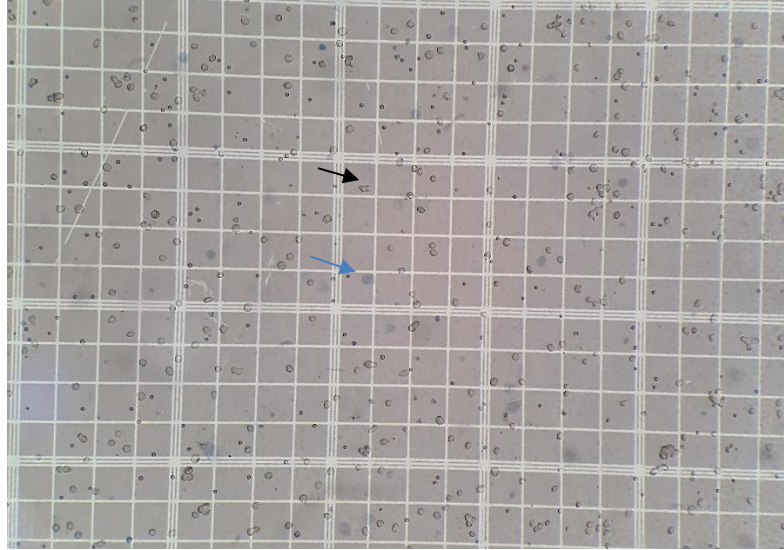
granulosa também são responsáveis pela regulação hormonal da fêmea através da síntese de estrógeno e progesterona (GONÇALVES et al., 2014).

O cultivo de células da granulosa permite elucidar as vias de sinalização, os fatores de crescimento e os hormônios envolvidos no desenvolvimento folicular e na cascata ovulatória.

2.2.1.1.1 Cultivo de células da granulosa de folículos ovarianos grandes

Ovários bovinos obtidos em frigorífico foram transportados ao laboratório em uma solução de NaCl 0,9% a 30°C contendo penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (50 µg/mL). Ao chegar ao laboratório, os ovários foram lavados em solução salina aquecida, álcool 70° e novamente em solução salina. Foram selecionados e armazenados em solução salina aquecida ovários com folículos maiores que 10 mm de diâmetro. Para a coleta das células da granulosa foi utilizado meio “flushing” (meio de cultivo DMEM/F12 (15 mM HEPES) suplementado com BSA 0,1%, bicarbonato de sódio (10 mM), penicilina (100UI/mL), estreptomicina (100 ug/mL) e heparina (1 UI/mL). As coletas foram realizadas em uma cabine de fluxo laminar com auxílio de seringa e agulha. Inicialmente era acessado o folículo escolhido pela cortical do ovário e o meio “flushing” injetado para descolar e coletar as células da granulosa. Após repetir esse procedimento para todos os folículos escolhidos, o conteúdo do tubo contendo as células era filtrado e centrifugado. A cada centrifugação o máximo possível de sobrenadante era removido e adicionado aproximadamente 10 mL de meio estoque (DMEM/F12 (15 mM HEPES) suplementado com BSA 0,1%, bicarbonato de sódio (10 mM), penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (100 ug/mL). Depois da última centrifugação o sobrenadante era removido e o *pellet* eluído. O volume da eluição variava de acordo com o tamanho do *pellet*. O próximo passo era realizar a contagem das células viáveis através da técnica de coloração Azul de Tripano em Câmara de Neubauer. Para isso era adicionado em um microtubo 10 µL de Azul de Tripano (0,4%) e 40 µL da eluição de células. Depois da diluição, a câmara de Neubauer era montada e levada ao microscópio no aumento de 200x e eram contados 5 quadrantes menores da câmara. A solução de Azul de Tripano penetra as células não viáveis e deixa-as coradas em azul. Dessa forma, apenas as células não coradas em azul eram contadas (Figura 5).

Figura 5 – Células da granulosa em Câmara de Neubauer (aumento de 200x). Células viáveis (seta preta) e células não viáveis (seta azul). Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (BioRep).



Fonte: arquivo pessoal, 2021.

Foi adicionado o volume eluído necessário para que cada poço ficasse com 1×10^6 células/mL. Além disso, era adicionado insulina (10 ng/mL), FSH (1 ng/mL) e 2% de SFB. As células eram cultivadas em incubadora a 37°C e com 5% de CO₂ em umidade saturada. Após 24 horas de cultivo, todo o sobrenadante era removido cuidadosamente, adicionado 900 µL de meio estoque e as placas retornavam para a incubadora por mais 18 horas. Após esse período, o cultivo era exposto aos tratamentos. Durante o período de estágio foram acompanhados dois experimentos de cultivo de células da granulosa de folículos grandes. O primeiro experimento utilizava beta-hidroxibutirato durante o cultivo, enquanto que no segundo, os compostos Senecionina e Seneciofilina foram utilizados.

2.2.1.1.2 Cultivo de células da granulosa de folículos ovarianos pequenos

Os ovários bovinos eram coletados em frigorífico e transportados ao laboratório em uma solução salina 0,9% a 30-35°C contendo penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (50 µg/mL). Ao chegar ao laboratório, os ovários eram lavados em solução salina aquecida, álcool 70° e novamente em solução salina. Os ovários eram manipulados no fluxo laminar e com a tesoura Mayo eram seccionados em sentido longitudinal. Todos os folículos entre 2 e 6 mm foram dissecados e depositados em um tubo de 50 mL contendo meio de lavagem (DMEN-F12, acrescido de bicarbonato de sódio, penicilina e estreptomicina). O conteúdo do tubo era transferido para uma placa de Petri contendo meio de lavagem e com auxílio de uma pinça

todos os folículos eram abertos para a liberação das células da granulosa. Todo o conteúdo presente na placa de petri era filtrado e passava pelos mesmos procedimentos descritos no item 2.2.1.1.1.

As células foram cultivadas em placas de 24 poços (1 mL/poço) durante 6 dias em DMEM/F12 (15mM HEPES) suplementado com bicarbonato de sódio (10 mM), albumina bovina (1 mg/mL), selenito de sódio (4 ng/mL), transferrina humana (5 ng/mL), penicilina (100UI/mL), estreptomicina (100 ug/mL), MEM solução de aminoácidos não essenciais (10 mM), androstenediona (10^{-7} M), FSH (1 ng/mL) e insulina bovina (10 ng/mL). A cada 48 horas era realizado a troca de meio de todos os poços da placa. Durante o período de estágio foram acompanhadas 2 rotinas de cultivo de células da granulosa de folículos pequenos que seriam utilizadas para estudos de microvesículas.

2.2.2 Produção in vitro de embriões bovinos

2.2.2.1 Coleta dos ovários e aspiração folicular

Os ovários bovinos eram coletados em frigorífico e transportados ao laboratório em uma solução salina 0,9% a 30-35°C contendo penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (50 µg/ml). Ao chegar ao laboratório, os ovários foram lavados em solução salina aquecida (35°C) e mantidos em banho-maria a 33°C até o momento da aspiração. A aspiração era realizada em uma bomba de vácuo com pressão de 10-15 mL/minuto. Em tubos eram puncionados somente os folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm.

2.2.2.2 Procura e seleção dos oócitos

Após a sedimentação, o fluido folicular foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm, enquanto os CCOs foram rastreados sob estereomicroscópio. No estereomicroscópio e com auxílio de um pescador (tubo microhematócrito acoplado em um sistema de sucção) era iniciado a procura dos CCOs (Figura 6). Os CCOs encontrados eram transferidos para uma placa de 35 mm de diâmetro contendo 2 mL de líquido folicular centrifugado que deveria ser mantida sobre uma placa térmica a 34°C.

Figura 6 – Visualização da placa de petri contendo líquido folicular e CCOs bovinos (seta) em estereomicroscópio.



Fonte: arquivo pessoal, 2021.

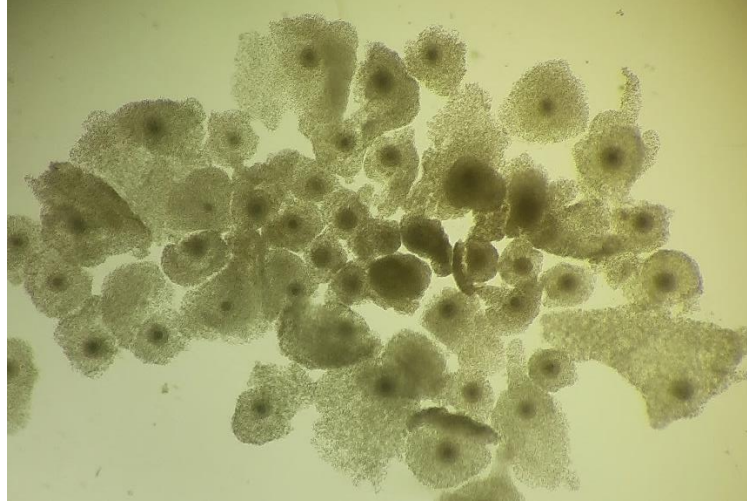
Após o rastreio os CCOs eram selecionados segundo Leibfried e First (1079) avaliando o citoplasma e as células do cumulus. Era selecionado apenas os CCOs de qualidade 1 (mais de três camadas de células do cumulus e ooplasma com coloração marrom e homogênea) e 2 (camada de células do cumulus parcialmente presente e ooplasma com coloração marrom heterogênea). Os oócitos desnudos ou com cumulus expandido eram considerados de qualidade 3 e 4 e não deveriam ser utilizados para cultivo. Após a seleção, os CCOs eram lavados 1 vez em líquido folicular centrifugado e 4 a 5 vezes em meio de maturação. Os oócitos eram então transferidos para a placa NUNC contendo 400 μ L/poço de meio maturação.

2.2.2.3 Maturação dos oócitos

Durante o processo de maturação o oócito passa por diversos eventos de competência para que obtenha sucesso no desenvolvimento embrionário. Esses eventos incluem transformações nucleares, citoplasmáticas e moleculares que iniciam com o pico de LH (*in vivo*) ou com a remoção do oócito de dentro do folículo (*in vitro*). Para que os oócitos sofressem as transformações necessárias eram cultivados em meio de maturação composto por TCM-199 (GIBCO 12340-030) suplementado com soro fetal bovino (10%) ou BSA (4%), LH (5 μ g/mL), FSH (0,5 μ g/mL), piruvato (0,2 mM), penicilina e estreptomicina por 22-24 horas. Durante o

cultivo as células do cumulus expandem (Figura 7) devido a produção de ácido hialurônico (GONÇALVES et al., 2008).

Figura 7 – Observação de CCOs bovinos expandidos após 18 horas de maturação.



Fonte: arquivo pessoal, 2021.

2.2.2.4 Fecundação *in vitro*

A fecundação era realizada 22-24 horas após a maturação dos oócitos. Pelo menos 3 horas antes do término do período de maturação era iniciado a preparação dos meios necessários para a fecundação. O meio FERT estoque era suplementado com piruvato de sódio (0,025 mg/mL), heparina (30 µg/mL), PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina), penicilina e estreptomicina. Para realizar a seleção espermática era necessário preparar o meio FERT para Percoll (FERT estoque, piruvato, penicilina, estreptomicina e BSA), o Percoll 90% (Percoll Amersham Biosciences e Talp-Sperm 10x) e Percoll 45% (Percoll 90% e FERT para Percoll). Após o preparo dos meios era realizado a montagem dos gradientes com 300 µL de Percoll 90% no fundo de um microtubo e 300 µL de Percoll 45% sobre o Percoll 90%. A palheta de sêmen era descongelada e o sêmen depositado em um microtubo estéril e aquecido. Em seguida, era avaliado a motilidade e vigor e depositado o sêmen sobre o gradiente de Percoll. O gradiente passava por centrifugação durante 2 minutos a 14.000 RFC e posteriormente o sobrenadante (400 µL) era descartado, adicionava-se no microtubo 1 mL do meio FERT para Percoll e uma nova centrifugação era realizada (45 segundos a 9.000 RCF). Após a centrifugação o sobrenadante era removido e era observado a formação de um pellet no fundo do microtubo contendo os espermatozoides com boa motilidade e vigor. Uma amostra de 10 µL de sêmen era

diluída em 90 µL de água para avaliar a concentração espermática na câmara de Neubauer. Era avaliado motilidade e vigor pós-percoll. A concentração era ajustada com meio FERT para obter a dose inseminante de 1×10^6 /mL de meio.

2.2.2.5 *Desnudamento*

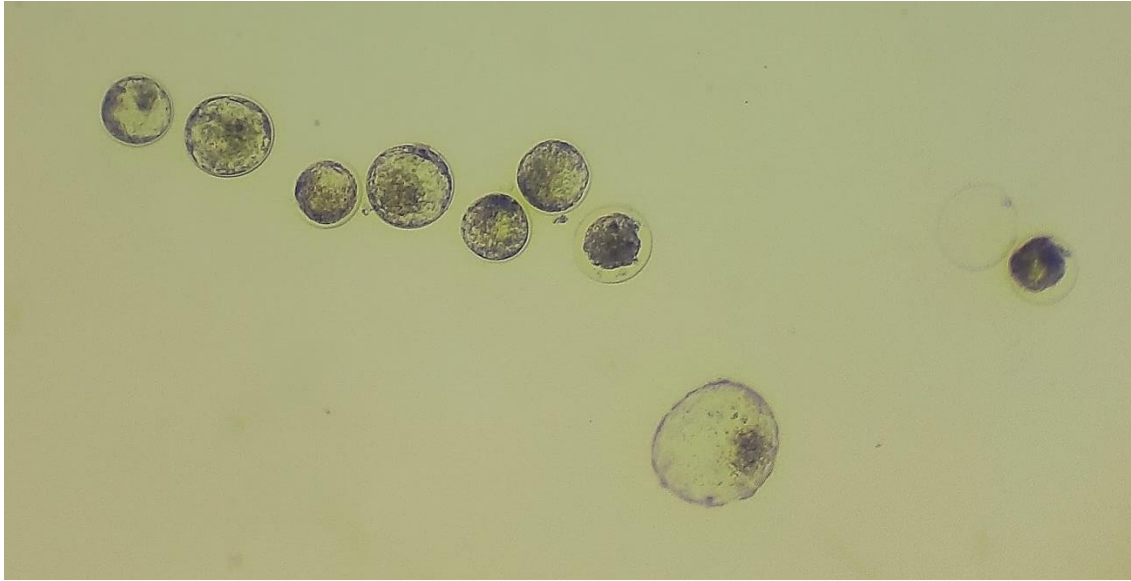
Após 18-22 horas da fecundação era realizado o desnudamento, etapa necessária para remoção das células do cumulus. Os prováveis zigotos eram transferidos para uma placa de lavagem contendo meio de fluído sintético do oviduto – SOF (SOF estoque, piruvato, SFB, penicilina e estreptomicina). Os zigotos eram levados para um microtubo contendo 50 µL de meio SOF e submetidos ao agitador por 3 minutos. Os zigotos desnudos encontrados eram passados para um poço de lavagem da placa NUNC (400 µL/poço de meio SOF) e posteriormente para o poço de cultivo. Os zigotos desnudos eram cultivados em uma incubadora de acrílico que possuía atmosfera controlada para 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C.

2.2.2.6 *Avaliação da clivagem e do desenvolvimento embrionário*

A avaliação da clivagem era realizada 24 horas após a realização do desnudamento. Eram considerados como clivados aqueles que continham no mínimo duas células. As estruturas não clivadas eram retiradas da placa de cultivo. Após a avaliação, a placa retornava para a incubadora e permanecia por 5 dias. A avaliação do desenvolvimento embrionário (Figura 8) era realizada de acordo com a classificação estabelecida pelo manual da IETS (mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido).

Na rotina do estágio foram realizadas avaliações no dia 7 e 8 de desenvolvimento embrionário (Tabela 4). A mórula (M) é encontrada geralmente no dia 5,5-6 do ciclo, onde observamos a massa celular ocupando a maior parte do espaço dentro da zona pelúcida. Entre os dias 6-6,5, essa massa celular se torna compacta e ocorre a formação de junções de adesão e oclusão entre as células. Essas formações preparam o embrião para a formação da blastocèle que se inicia nos dias 6,5-7 do ciclo, através de um gradiente osmótico que atrai água para o espaço intercelular dando origem ao blastocisto inicial (BI) com formação de duas populações celulares distintas (trofoblasto e massa celular interna).

Figura 8 – Avaliação do desenvolvimento embrionário no dia 7 do cultivo.



Fonte: arquivo pessoal, 2021.

O blastocisto (BL) é encontrado geralmente nos dias 7-7,5 do ciclo e é caracterizado pelo aumento da blastocele. Nos dias 7,5-7 o embrião aumenta de tamanho e a zona pelúcida se torna mais delgada (BX) levando a eclosão devido o rompimento da zona pelúcida (BE).

Tabela 4 – Número total de embriões avaliados durante o período de estágio.

Dia	Blastocisto				
	M	BI	BL	BX	BE
D7	0	12	75	36	0
D8	7	0	30	58	13

2.2.2.7 Embriões partenogénéticos

A produção de embriões partenogénéticos é uma técnica em que o embrião se desenvolve sem que o oócito seja fecundado. Para simular esse processo existem diversos compostos físicos e químicos que podem ser utilizados. Durante o período de estágio foi realizada 1 rotina de ativação embrionária para ajuste de protocolo de imunofluorescência.

Os oócitos foram maturados (como descrito no tópico 2.2.2.3) e após 22-24 h foram selecionados e desnudados apenas os oócitos com extrusão do 1º corpúsculo polar. Os oócitos selecionados eram transferidos para um poço contendo ionomicina (5 µM) durante 5 minutos e lavados em meio maturação (descrito em 2.2.2.3) suplementado com 2 mg/mL de albumina

sérica bovina, 100 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina. Posteriormente eram incubados em um poço contendo 6-DMAP por 4 horas e transferidos para meio SOF (HOLM et al., 1999) onde foram cultivados em atmosfera controlada a 5% de CO₂ em ar, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C. Foi realizada a avaliação de clivagem no dia 4 pós-ativação e do desenvolvimento embrionário no dia 7 pós-ativação.

2.2.3 Biologia Molecular

Inicialmente o estudo das estruturas vivas era realizado observando apenas suas estruturas morfológicas a nível macroscópico e microscópico. A estrutura molecular do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) foi descoberta em 1953 por Watson e Crick e a partir disto, uma sequência de descobertas demonstraram que esta molécula permitia compreender melhor as características dos seres vivos (ALBERTS et al., 2017).

A biologia molecular surge visando explicar como os processos biológicos se relacionam com o material genético dos organismos, estudando essas informações genéticas e a função celular através do DNA, RNA, proteínas e genes (WESTERHOFF; PALSSON, 2004). Na rotina do laboratório os testes moleculares são amplamente utilizados para estudar a fisiologia celular através da análise de expressão gênica. Estas técnicas serão descritas detalhadamente nos tópicos abaixo.

2.2.3.1 Imunofluorescência de embriões para detecção de proteína

A imunofluorescência é uma técnica que utiliza anticorpos ligados a fluoróforos para detectar antígenos específicos (ODELL; COOK, 2013). Os anticorpos são proteínas formadas por quatro subunidades ligadas entre si e atuam de forma específica, ligando-se especificamente a um determinado antígeno (TIZARD, 2014). A técnica de imunofluorescência pode ser direta ou indireta (AOKI et al., 2010). A imunofluorescência direta usa anticorpos com fluorescência que se ligam diretamente ao antígeno alvo. Já a imunofluorescência indireta é realizada em duas etapas, na qual um anticorpo não marcado se liga ao alvo e em seguida é adicionado um anti-anticorpo conjugado com um fluoróforo que se liga ao primeiro anticorpo (MOHAN et al., 2008). Durante o estágio foram realizadas rotinas da técnica indireta de imunofluorescência para auxiliar na caracterização das ubiquitinas no desenvolvimento embrionário inicial de bovinos. Os embriões foram submetidos a UV e coletados em diferentes dias do cultivo, lavados

em PBS, fixados em paraformaldeído 4% e armazenados em solução de manutenção a 4°C até a realização da imunofluorescência.

Como descrito na tabela 5, foi acompanhado apenas 1 rotina de fixação de embriões, onde foram fixados 8 embriões partenogênicos que foram utilizados para ajustar o protocolo de imunofluorescência. Após o ajuste, foram realizadas 30 rotinas de imunofluorescência com um total de 90 embriões.

Tabela 5 – Rotinas de imunofluorescência e número de amostras acompanhadas.

Atividades	Número de rotinas	Número de amostras
Embriões fixados para posterior IF	1	8
Embriões submetidos a IF	30	90
Total	31	98

A primeira etapa do protocolo utilizado para imunofluorescência foi realizar a permeabilização da parede celular dos embriões com a imersão dos embriões em BSA 0,3% e Triton 100X 0,2% em PBS durante 3 h a 37°C para permitir a entrada do anticorpo na célula e a sua ligação com a proteína de interesse. Após isso, os embriões foram lavados em uma solução de bloqueio (BSA 3% e Tween20 em PBS por 1 h a 37°C). Em seguida aplicou-se o anticorpo primário (Anti-H2Ax) que se ligou a proteína de interesse. No dia seguinte os embriões foram incubados com o anticorpo secundário (anti-anti H2Ax por 1 h em temperatura ambiente), lavados em solução de bloqueio e incubados com o fluoróforo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que se ligou ao anticorpo secundário. O fluoróforo é uma molécula que sofre excitação por um determinado comprimento de onda e emite fótons de luz fluorescentes a um comprimento de onda superior permitindo a visualização da fluorescência (ODELL; COOK, 2013). A lâmina de microscópio foi montada com uma gota de Mowiol e a leitura realizada em microscópio de fluorescência composto por uma fonte de luz de alta intensidade, filtros de excitação para o fluoróforo e filtros-barreira que removem interferentes e garantem a transmissão eficiente da luz emitida.

2.2.3.2 *Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real*

Na atualidade as técnicas de amplificação e detecção de ácidos nucleicos são utilizadas em diversas áreas da ciência e possuem ampla gama de aplicações (BUSTIN; MUELLER, 2005). A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) tornou-se o principal método utilizado para análise de expressão gênica por detectar e quantificar os produtos gerados durante cada ciclo de amplificação em tempo real (FLEIGE; PFAFFL, 2006). A RT-qPCR compreende diversas etapas: 1) O RNA é isolado das células ou tecidos alvo; 2) É realizado a transcrição reversa de mRNA em cDNA; 3) Primers são utilizados para amplificar um segmento do cDNA de interesse; 4) A concentração inicial do segmento selecionado é calculada a partir da fase exponencial da reação (WAGNER, 2013).

2.2.3.2.1 *Extração de RNA*

Para ter acesso ao material genético das células é necessário realizar o isolamento do RNA mantendo sua integridade e qualidade. Existem diversos métodos disponíveis para a extração de RNA, como por exemplo as técnicas de TRIzol, mini TRIzol e coluna que se diferem pelo custo e pela eficiência na recuperação do RNA das amostras. Durante a rotina do estágio foram acompanhadas 9 rotinas (Tabela 6) de extrações de RNA com kits comerciais de colunas totalizando 141 amostras extraídas. Essas colunas são compostas por uma membrana de sílica responsável por isolar o RNA durante as etapas de lise celular e lavagem.

O protocolo utilizado para extração de células da granulosa (PureLink™ RNA Mini Kit; Invitrogen™) e embriões (PicoPure™ RNA Isolation Kit) seguiam as orientações dos fabricantes. De modo geral, os protocolos iniciavam com uma etapa de lise para liberar os ácidos nucleicos do núcleo celular e proporcionar condições ideais para que o material genético se ligasse a membrana. O principal desafio na extração de RNA é a presença de RNAses estáveis que fazem com que o RNA seja degradado rapidamente. Por isso, as amostras de células da granulosa e embriões eram submetidas a essa etapa já no momento da coleta sendo armazenadas no tampão de lise a -80°C até que fosse realizado a extração do RNA.

As amostras de células da granulosa eram descongeladas e submetidas ao Tissue Lyser LT (QIAGEN), responsável por homogeneizar as amostras através de agitação de alta velocidade. Posteriormente, era adicionado etanol e levado as amostras para centrifugação para realizar a desnaturação de proteínas (devido a presença de sais de alta concentração) e para que

os ácidos nucleicos se ligassem à coluna. Durante essa etapa todas as impurezas passam diretamente pela membrana. Em seguida as amostras eram submetidas a duas lavagens para remover resíduos de proteínas e sais e uma centrifugação adicional para secagem da membrana. A última etapa era realizar a eluição em água livre de nuclease. Após a eluição, as amostras eram submetidas a quantificação e transcrição reversa ou armazenadas a -80°C .

Tabela 6 - Rotinas de extração de RNA e número de amostras acompanhadas durante o período de estágio.

Amostras	Número de rotinas	Número de amostras
Embriões	2	24
Células da granulosa	7	117
Total	9	141

2.2.3.2.2 *Quantificação de RNA*

Na rotina do laboratório a espectrofotometria é uma técnica utilizada para avaliar a concentração e a qualidade do RNA das amostras. É comum que as amostras possuam concentrações diferentes de RNA e para realizar a comparação correta da expressão dos genes é necessário que o cDNA seja feito com a mesma concentração para todas as amostras. A quantificação de RNA era feita somente no dia que as amostras extraídas fossem submetidas a transcrição reversa. A primeira etapa solicitada pelo programa do nanodrop era adicionar 1 μL de água livre de nucleases no pedestal base de leitura para lavar o sistema. Posteriormente, era adicionado 1 μL de água livre de nucleases que era utilizado como calibrador, ou seja, a mensuração de RNA deveria ser 0 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Após isso, já poderia adicionar 1 μL da amostra e observar os resultados da razão 260/280 e da quantificação de RNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$). Durante o período de estágio foram realizadas 4 rotinas de quantificação de amostras, totalizando 117 amostras de 2 experimentos de cultivo de células da granulosa de folículos ovarianos grandes.

2.2.3.2.3 *Transcrição reversa (cDNA)*

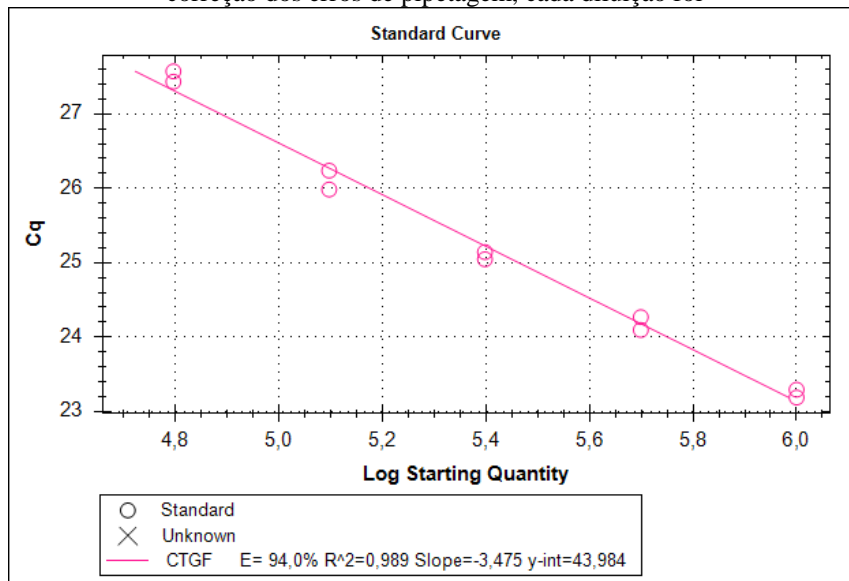
Para realizar o estudo da expressão de genes é necessário que ocorra a transcrição reversa do RNAm extraído com a formação do DNA complementar (cDNA), que será amplificado através do RT-qPCR. Na rotina do laboratório, todas as amostras tem a sua

concentração de cDNA padronizada. O primeiro passo era separar um microtubo de 0,2 mL para cada amostra, identificar e adicionar o volume de água e amostra para a concentração correta de cDNA. Para realizar a transcrição reversa, era utilizado o iScript™ cDNA Synthesis Kit da BioRad que possui transcriptase reversa e o Mix com os desoxirribonucleotídeos e RNA polimerase. Em um microtubo de 1,5 mL era adicionado o volume da transcriptase reversa e do Mix para todas as amostras. Após isso, era acrescentado a transcriptase reversa e o Mix 5x iScript na proporção 1:4 em cada amostra e o microtubo era incubado no termociclador. No termociclador as amostras ficavam 5 minutos a 25°C, 20 minutos a 46°C e 1 minuto a 95°C. Durante o período de estágio foram realizadas 6 rotinas de transcrição reversa com 24 amostras de embriões e 117 amostras de células da granulosa.

2.2.3.2.4 Reação em cadeia da Polimerase

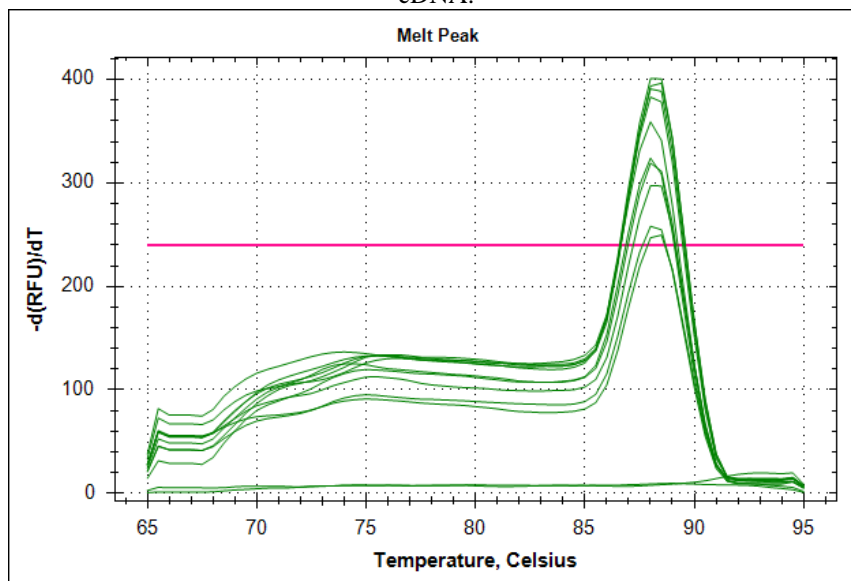
A técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) permite amplificar, detectar e quantificar em poucas horas o material genético das amostras (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011). Inicialmente era necessário verificar a eficiência de amplificação da reação. Foram realizadas reações em duplicata utilizando um pool de cDNA das amostras com o fator de diluição 2. A curva padrão é obtida pela regressão linear do valor do ciclo de amplificação (Ct) sobre o log da quantidade inicial de cDNA, ou seja, a amostra mais concentrada deve apresentar um Ct menor que a mesma amostra diluída mais vezes. O valor da eficiência do primer deve ser próximo de 100% (Figura 9). Além disso, também deve ser analisado a curva de dissociação (curva de Melt) que determina a temperatura responsável pela dissociação das fitas de cDNA (Figura 10). Quando um primer é específico todas as amostras dissociam na mesma temperatura formando um único pico.

Figura 9 – Curva padrão de RT-PCR tempo real. Diluição em série (duplicata) das amostras de cDNA obtido de células da granulosa. O valor de eficiência do primer para CTGF está dentro do esperado ($E=103,8\%$). Para correção dos erros de pipetagem, cada diluição foi



Fonte: arquivo pessoal, 2021.

Figura 10– Curva de dissociação do CTGF. Determina em qual temperatura houve a dissociação das fitas de cDNA.



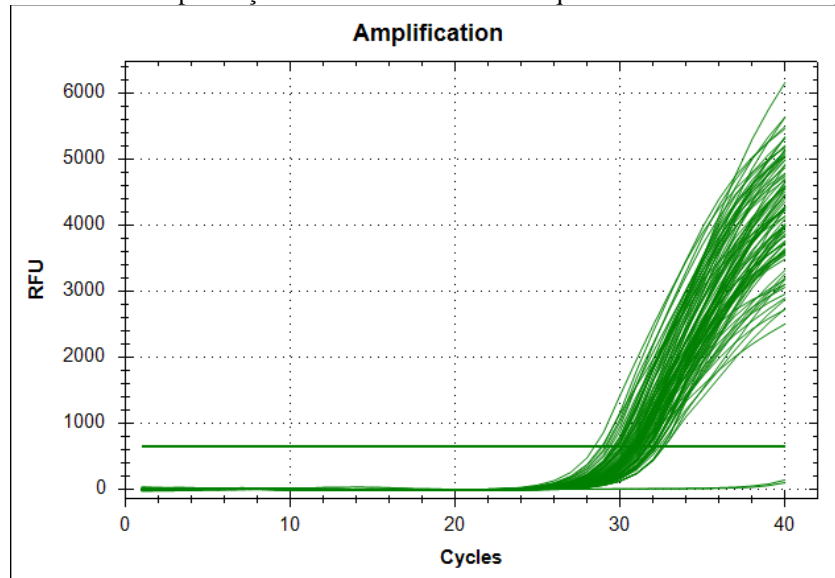
Fonte: arquivo pessoal, 2021.

Com a curva padrão era obtido a diluição que seria utilizada para a RT-qPCR das amostras. Durante a reação o produto gerado é detectado e têm aumento exponencial. Após alguns ciclos, a reação tende a se estabilizar dando origem a uma fase platô. Para a escolha da diluição das amostras, era considerado a diluição em que o Cq não estivesse em platô. Após diluir as amostras, era confeccionado as soluções de trabalho dos primers (sense e anti-sense)

que seriam utilizados naquela rotina. O master mix era preparado para cada gene contendo 1 μL /amostra de água livre de nucleases, 1 μL /amostra de primer sense e 1 μL /amostra de primer anti-sense. Era pipetado 2 μL de amostra por poço, em duplicata. Após o término da pipetagem, era adicionado 5 μL /amostra de GoTaq qPCR Master Mix (substância fluorescente e DNA polimerase) no master mix, homogeneizado e adicionado 8 μL em cada poço. O volume final de cada poço deveria ser de 10 μL . Para finalizar a placa era selada com um material de vedação e centrifugada para todo o conteúdo ficar no fundo dos poços. A placa era levada ao termociclador de RT-qPCR e a reação iniciada.

Durante o período de estágio foram acompanhadas 24 rotinas de RT-qPCR de amostras de células da granulosa e embriões. Após a finalização da reação os resultados eram interpretados através da curva de amplificação (Figura 11), que mostra quando a expressão do gene foi suficiente para o fluoróforo emitir sinal detectável. Também era analisado os valores médios das duplicatas dos C_qs que mostra se houve desvio de pipetagem.

Figura 11 – Curva de amplificação do CTGF indicando em qual ciclo iniciou a fase exponencial.



Fonte: arquivo pessoal, 2021.

3 CONCLUSÃO

A realização do estágio curricular obrigatório no Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria foi muito importante para consolidação de todo o trabalho desenvolvido durante a graduação. Durante este período foi possível acompanhar o trabalho de pesquisadores e a execução de diversos experimentos que colaboraram para o aprendizado de novas técnicas e para o desenvolvimento do pensamento crítico gerando maior interesse pela área.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: 2017.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. v. 2p. 215–253.
- AOKI, V. et al. **Direct and indirect immunofluorescence**. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20944909/>>. Acesso em: 30 mar. 2021
- BUSTIN, S. A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clinical Science**, v. 109, n. 4, p. 365–379, 1 out. 2005.
- FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 126–139, 1 abr. 2006.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells**. 3. ed. New York: WileyLiss, 2005.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. & FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2014.
- HARRISON, R. G. et al. Observations of the living developing nerve fiber. **The Anatomical Record**, v. 1, n. 5, p. 116–128, 1907.
- LADEIRA, P. R. S. DE; ISAAC, C.; FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Revista de Medicina**, v. 90, n. 1, p. 47, 1 mar. 2011.
- 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.
- MOHAN, K. et al. Techniques of immunofluorescence and their significance. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 74, n. 4, 2008.
- MUCARI, T. B. et al. Análise genética do período de gestação em animais de um rebanho Canchim: Estimacão de parâmetros genéticos e escolha entre modelos animais alternativos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 6, p. 1211–1216, jun. 2011.
- ODELL, I. D.; COOK, D. Immunofluorescence techniques. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 1, p. 1–4, 1 jan. 2013.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: Uma introdução**. 9. ed. Rio de Janeiro: 2014.
- VERTREES, R. A. et al. Tissue Culture Models. In: ZANDER, D. S. et al. **Molecular Pathology of Lung Diseases**. New York: Springer, 2008. p. 150–165.
- WAGNER, E. M. Monitoring gene expression: Quantitative real-time RT-PCR. **Methods in**

Molecular Biology, v. 1027, p. 19–45, 2013.

WESTERHOFF, H. V.; PALSSON, B. O. **The evolution of molecular biology into systems biology**. *Nature Biotechnology*, 2004.