

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS POR
FECUNDAÇÃO *IN VITRO* APÓS MICROINJEÇÃO CITOPLASMÁTICA PARA A
EXPRESSÃO EPISSOMAL TRANSIENTE DO GENE *IGF2***

Karine Campagnolo

PORTO ALEGRE

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos produzidos por fecundação *in vitro* após microinjeção citoplasmática para a expressão epissomal transiente do gene *IGF2*

Autor: Karine Campagnolo

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Biotécnicas e Fisiopatologia da Reprodução Animal

Orientador: Marcelo Bertolini

PORTO ALEGRE

2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Campagnolo, Karine

Desenvolvimento in vitro de embriões bovinos produzidos por fecundação in vitro após microinjeção citoplasmática para a expressão epissomal transiente do gene IGF2 / Karine Campagnolo. -- 2019.

78 f.

Orientador: Marcelo Bertolini.

Coorientador: Jose Luis Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Fecundação in vitro. 2. imprinting genômico. 3. sistema IGF. 4. microinjeção citoplasmática. 5. bovinos. I. Bertolini, Marcelo, orient. II. Rodrigues, Jose Luis, coorient. III. Título.

Karine Campagnolo

**Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos produzidos por fecundação *in vitro* após
microinjeção citoplasmática para a expressão epissomal transiente do gene *IGF2***

Aprovado em 28 de fevereiro de 2019.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Marcelo Bertolini, Orientador
Faculdade de Veterinária
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. José Luiz Rodrigues
Faculdade de Veterinária
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Fabiana Forell
Faculdade de Veterinária
Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC)

Dra. Paula Rodrigues Villamil
Recombinetics Inc.

AGRADECIMENTOS/DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus pela vida e sinto-me abençoada pela oportunidade chegar até o dia de hoje. Sou imensamente grata pelas pessoas que conheci, pelo aprendizado e momentos que compartilhei nestes dois anos do mestrado, foram muito importantes para meu desenvolvimento como ser humano e profissional.

Aos meus colegas de pós-graduação, agradeço pela ajuda nos experimentos e pela amizade. Também agradeço ao meu Orientador Marcelo Bertolini, por me acolher, guiar e abrir novos horizontes em meu caminho na pesquisa.

Dedico este trabalho a minha família, meus pais José Carlos e Neusa, minha irmã Camila e ao Fabrício e em especial minha Irmã Karla e ao Pedro por me acolherem em Porto Alegre. Por fim e em especial, ao Vitor por dividir comigo esse caminho, pela paciência, incentivo e ajuda durante o mestrado.

RESUMO

Embriões bovinos produzidos *in vitro* por fecundação *in vitro* (PIV/FIV) e transferência nuclear (TN) apresentam diferenças bioquímicas, metabólicas, moleculares, histológicas e de desenvolvimento quando comparados aos seus equivalentes *in vivo*. Destacam-se anormalidades tanto pré-natais durante a placentação e mortalidade embrionária por subdesenvolvimento inicial, quanto pós-natais, caracterizados pela Síndrome do Neonato Anormal (AOS). Estudos evidenciam que há importantes alterações nos padrões de *imprinting* genômico em embriões de PIV, especialmente no padrão de expressão de *imprinting* do sistema IGF, sendo o ligante *IGF2*, um gene de expressão paterna de caráter pleiotrópico e de efeito promotor de crescimento e diferenciação, e o receptor *IGF2R*, um gene de expressão materna que contrapõe os efeitos do gene *IGF2*. Assim, o presente estudo objetivou realizar a superexpressão epissomal transiente do gene *IGF2* pela técnica de microinjeção citoplasmática em embriões bovinos no estágio de 1-célula produzidos por FIV visando o aumento da eficiência nos índices de desenvolvimento, cinética e qualidade embrionária *in vitro* até o Dia 7 de desenvolvimento. Após nove repetições, um total de 1.752 complexos *cumulus*-oócito (CCOs) bovinos foram maturados e fecundados *in vitro* e posteriormente segregados em seis grupos experimentais: um controle não-microinjetado, um controle microinjetado com tampão tris-EDTA, ou TE (0 ng/μL), e quatro grupos de microinjeção com doses crescentes (10, 20, 40, 80 ng/μL) do vetor de expressão epissomal do gene *IGF2* acompanhado do gene da proteína *GFP* em TE. No Dia 2 de desenvolvimento, foram avaliadas as taxas de clivagem e sobrevivência pós-microinjeção, além do número de blastômeros, e no Dia 7 de desenvolvimento, após cultivo *in vitro*, avaliaram-se as taxas de blastocisto, estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária, taxa de embriões fluorescentes e número total de células em blastocistos. A microinjeção citoplasmática de zigotos foi efetiva em dispor o vetor de expressão no ooplasma, independente dos grupos, com média de 58% de blastocistos com fluorescência positiva no Dia 7 de desenvolvimento. A dose de 10 ng/μL de microinjeção do vetor promoveu uma menor taxa de blastocistos (10,4%), porém com blastocistos em estádios mais avançados de desenvolvimento (93,0%), com melhor qualidade morfológica (73% de Grau 1) e maior número de células (116,0 ± 3,0) em relação ao controle FIV não microinjetado (23,3%, 75,0%, 58,0%, e 75,0 ± 6,8, respectivamente). Em resumo, a microinjeção de embriões com um vetor de superexpressão do gene *IGF2* promoveu uma taxa de desenvolvimento similar aos controles, com diferenças quando se utilizou a dose de 10 ng/μL, com uma menor taxa de blastocistos, porém com maior cinética de desenvolvimento, qualidade morfológica e número de células totais, indicando um possível efeito promotor do crescimento do gene *IGF2* no desenvolvimento de embriões bovinos de PIV, do estágio de 1-célula até blastocisto.

Palavras-chave: Fecundação *in vitro*, *imprinting* genômico, sistema *IGF*, microinjeção citoplasmática, bovinos.

ABSTRACT

Bovine IVP embryos produced by in vitro fertilization (IVF) or nuclear transfer (TN) usually have significant biochemical, metabolic, molecular, histological and developmental differences through birth and beyond when compared to the in vivo counterparts. To note, prenatal abnormalities during placentation and embryonic mortality due to early underdevelopment, and postnatal clinical symptoms, collectively named the Abnormal Offspring Syndrome (AOS,) are common occurrences for IVP embryos. Studies show that important changes usually occur in the pattern of genomic imprinting in IVP embryos, especially in the imprinting pattern of the IGF system, with the IGF2 ligand being a pleiotropic paternally expressed gene with a growth promoting effect, and the receptor IGF2R being a maternally expressed gene that counteracts the effects of the IGF2 gene. Thus, the present study aimed to induce a transient episomal overexpression of the IGF2 gene in bovine IVP embryos following the cytoplasmic microinjection at the 1-cell stage for the increase in embryo development, kinetics and morphological quality up to Day 7 of development. After nine replicates, a total of 1,752 bovine cumulus-oocyte complexes (CCOs) were matured and fertilized in vitro and subsequently segregated into six experimental groups: a non-microinjected control group, a microinjected control group using only tris-EDTA buffer, or TE (0 ng/ μ L), and four microinjection groups at increasing doses (10, 20, 40, 80 ng/ μ L) of the vector in TE for the episomal expression of the IGF2 and the GFP genes. On Day 2 of development, cleavage and post-microinjection survival rates were evaluated, in addition to the estimation of the number of blastomeres. On Day 7 of development, blastocyst rates and stage of development, embryo quality, GFP fluorescence and total cell numbers were evaluated in resulting blastocysts after in vitro culture. Cytoplasmic microinjection of zygotes was effective in delivering the expression vector into the ooplasm, irrespective of the groups, with 58% of positive GFP fluorescence in Day-7 blastocysts. Considering developmental rates and embryo kinetics, the 10 ng/ μ L microinjection vector dose promoted a lower blastocyst rate (10.4%), but with blastocysts at more advanced stages of development (93.0%), better morphological quality (73% Grade 1) and higher number of cells (116.0 ± 3.0) than non-microinjected IVF controls (23.3%, 75.0%, 58.0%, and 75.0 ± 6.8 , respectively). In summary, the microinjection of embryos with an IGF2 gene overexpression vector promoted a developmental rate similar to IVF controls, with differences only when the 10-ng/ μ L dose was used, with a lower blastocyst rate, but with higher developmental kinetics, morphological quality and total number of cells, indicating a possible growth promoting effect of the IGF2 gene on development of bovine IVP embryos, from the 1-cell to the blastocyst stages.

Keywords: *In vitro fertilization, genomic imprinting, IGF system, cytoplasmic microinjection, cattle.*

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1.** Proportion (%) of embryo stages of development (1-, 2-, 4-, and 8-cell stage embryos) on Day 2 of development of IVF-derived bovine embryos, per experimental group. Numbers within each column represent the actual total number of embryos per stage of development, per group..... 60
- Figure 2.** Distribution of embryo stage (Stage 5: early blastocyst; Stage 6: blastocyst; Stage 7: expanded blastocyst) for IVF-derived bovine embryos on Day 7 of development, per experimental group. a,b: Columns without common superscripts between groups differ, for $P < 0.05$. A,B: Columns without common superscripts within each group differ, for $P < 0.05$ 61
- Figure 3.** Distribution of embryo quality (Grade 1: excellent; Grade 2: good; Grade 3: poor) for IVF-derived bovine embryos on Day 7 of development, per experimental group. a,b: Columns without common superscripts between groups differ, for $P < 0.05$. A,B: Columns without common superscripts within each group differ, for $P < 0.05$ 62
- Figure 4.** Fluorescence level by intensity (low, medium, high) in Day-7 bovine IVP blastocysts following intracytoplasmic microinjection with distinct IGF2 expression vector doses in 1-cell stage embryos. a,b: Columns without common superscripts between groups differ, for $P < 0.05$. A,B: Columns without common superscripts within each group differ, for $P < 0.05$ 63
- Figure 5.** Total cell numbers (means \pm s.e.m) for IVF-derived bovine embryos on Day 7 of development, per experimental group. a,b: Columns without common superscripts differ, for $P < 0.05$ 64

LISTA DE TABELAS

- Table 1.** Survival and cleavage rates on Day 2 and blastocyst rates on Day 7 of development of IVF-derived bovine embryos following intracytoplasmic microinjection (IM) at the 1-cell stage embryo on Day 1 of development 65
- Table 2.** Probability outcomes and relative efficiency for survival after microinjection (MI), development to the blastocyst stage, positive GFP fluorescence, and development to more advanced stages of development (stages 6 and 7) with better morphological quality (grade 1) by experimental group, from the total number of COCs used for IVF in each group 66

LISTA DE ABREVIATURAS

TRA	Tecnologias de reprodução assistida
IA	Inseminação artificial
TE	Transferência de embriões
PIV	Produção <i>in vitro</i>
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
TNCS	Transferência nuclear de célula somática
CCOs	Complexos <i>cumulus</i> -oócito
RNA _m	RNA mensageiro
FSH	Hormônio folículo estimulante
OPU	Aspiração folicular ovariana guiada por ultrassonografia
MPF	Fator promotor da meiose
VG	Vesícula germinativa
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoide
MCI	Massa celular interna
TE	Trofectoderma
CL	Corpo lúteo
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
IFN-τ	Interferon tau
AOS	Síndrome do Neonato Anormal (<i>Abnormal Offspring Syndrome</i>)
DMRs	Regiões diferencialmente metiladas
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (<i>Insulin-like growth factor 1</i>)
IGF1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>)
IGF2	Fator de crescimento semelhante à insulina 2 (<i>Insulin-like growth factor 2</i>)
IGF2R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 2 (<i>Insulin-like growth factor 2 receptor</i>)
IR	Receptor de insulina
IGFBPs	Proteínas de ligação do IGF (<i>IGF-binding proteins</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1.	Formação e desenvolvimento gestacional	14
2.1.1.	Gameta feminino: competência, contribuição para o desenvolvimento embrionário e maturação in vitro	14
2.1.2.	Desenvolvimento embrionário.....	16
2.1.3.	Fase fetal	22
2.2.	Problemas de desenvolvimento relacionados à PIV de embriões bovinos	23
2.2.1.	Período pré-natal	24
2.2.2.	Período pós-natal	26
2.3.	<i>Imprinting</i> genômico	28
2.3.1.	Teoria do conflito parental: um cabo-de-guerra biológico	30
2.3.2.	Sistema IGF	31
2.3.2.1.	Ligantes, receptores e proteínas de ligação.....	31
2.3.2.2.	Efeito no desenvolvimento embrionário e PIV de embriões	35
2.4.	Manipulação epigenômica: vetores de expressão episomal	37
3.	HIPÓTESES E OBJETIVOS	40
3.1.	Hipóteses	40
3.2.	Objetivos gerais	40
3.3.	Objetivos específicos	40
4.	CAPÍTULO ÚNICO: <i>In vitro</i> development of IVF-derived bovine embryos following cytoplasmic microinjection for the episomal expression of the <i>IGF2</i> gene	42
5.	CONCLUSÕES	68
6.	PERSPECTIVAS	69
7.	REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento básico fisiológico na reprodução animal é essencial para a manipulação dos gametas masculino e feminino e o entendimento dos eventos que ocorrem durante a gestação dos mamíferos, com enfoque especial nesta revisão na fêmea bovina. Dentro disso, o trato reprodutivo da fêmea está envolvido diretamente na formação do conceito, desde o desenvolvimento do gameta na gônada até a implantação embrionária e placentação, oferecendo todo o aporte de nutrientes necessários para o desenvolvimento da progênie. A partir daí, a uso das Tecnologias de Reprodução Assistida (TRAs) em bovinos como a inseminação artificial (IA) e a produção *in vivo* de embriões, pela superovulação, IA e transferência de embriões (TE), ou a produção *in vitro* de embriões (PIV) pela fecundação *in vitro* (FIV), clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS) ou mesmo a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), têm sido utilizadas tanto para estudos de processos fisiológicos, bioquímicos e patológicos, quanto para aplicações práticas de impactos econômicos positivos na produção animal.

Interessantemente, diferenças bioquímicas, metabólicas, moleculares, histológicas e no desenvolvimento embrionário até o nascimento são observadas a partir de embriões produzidos *in vitro* comparados aos equivalentes *in vivo* (THOMPSON, 1997). Destacam-se as anormalidades da placentação e mortalidade embrionária que aparecem de forma mais evidenciada após a FIV ou TNCS e posterior cultivo *in vitro* (CIV) até a fase de blastocisto (BERTOLINI *et al.*, 2002a). Durante este processo de PIV de embriões bovinos, já foram identificados fatores moleculares e epigenéticos importantes que regulam o desenvolvimento embrionário inicial até o nascimento e que podem estar desregulados após a aplicação destas TRAs. Dentre eles, estudos evidenciam que há importantes alterações nos padrões do *imprinting* genômico, ou seja, aqueles genes com apenas um alelo parental específico com expressão ativa, enquanto o outro sempre será silenciado por processos epigenéticos típicos (KEVERNE, 2015; HEINZMANN *et al.*, 2011). Embriões bovinos de PIV demonstram comumente mudanças no padrão de expressão de genes de *imprinting*, em especial do sistema *IGF*, mais especificamente do ligante *IGF2* e seu receptor *IGF2R* (SUTEEVUN-PHERMTHAI *et al.*, 2009, LOPES *et al.*, 2017).

Os genes do ligante *IGF2* e de seu receptor *IGF2R* estão notoriamente relacionados ao controle da regulação do crescimento e desenvolvimento embrionário, fetal e placentário ao longo da gestação em mamíferos (LIU *et al.*, 2008, HAN *et al.*, 2013, MIKAELSSON *et*

al., 2013), e a expressão destes durante o processo de PIV já foi demonstrada desde oócitos imaturos até blastocistos eclodidos (LOPES *et al.*, 2017), parecendo estarem alteradas durante o desenvolvimento *in vitro* e mesmo *in vivo* (BERTOLINI *et al.*, 2002a). Além disso, a perda permanente do *imprinting* do receptor *IGF2R* e do ligante *IGF2* acabam resultando em um supercrescimento fetal e letalidade pós-natal ou nanismo e subdesenvolvimento, respectivamente (LAU *et al.*, 1994, LUDWIG *et al.*, 1996). Ainda, anormalidades de desenvolvimento causadas mais especificamente pelas tecnologias reprodutivas de FIV e clonagem por TNCS podem interferir no padrão de crescimento fetal e placentário, podendo resultar em um conjunto de sintomas denominado de *Abnormal Offspring Syndrome* (AOS), a qual inclui um crescimento fetal acelerado e aumento do peso ao nascimento, anormalidades anatômicas, fisiológicas e metabólicas, e a redução da sobrevivência pós-natal.

Sendo assim, o presente estudo objetivou desenvolver um trabalho relacionado à biologia do desenvolvimento, buscando a expressão epissomal do gene *imprinting IGF2* pela técnica de microinjeção intracitoplasmática em embriões bovinos no estágio de 1-célula produzidos *in vitro* visando o aumento da eficiência na produção embrionária, com impactos na taxa de blastocistos, cinética de desenvolvimento, qualidade embrionária e número de células após cultivo, *in vitro* até o Dia 7 de desenvolvimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Formação e desenvolvimento gestacional

2.1.1. Gameta feminino: competência oocitária e a contribuição para o desenvolvimento embrionário

Já foi demonstrado que a competência meiótica e o desenvolvimento *in vitro* de oócitos estão relacionados ao tamanho do folículo ovariano de origem (MACHATKOVA *et al.*, 2004), ao estágio do ciclo estral da fêmea doadora (MACHATKOVA *et al.*, 1996) e ao nível de atresia influenciado por outros folículos, principalmente o folículo dominante (HAGEMANN, 1999). De certo modo, tal circunstância está relacionada a toda a competência gradual que o oócito adquire durante o desenvolvimento folicular. Na técnica de PIV de embriões utilizando-se ovários de abatedouro, complexos *cumulus*-oócito (CCOs) são aspirados de folículos entre três e oito milímetros de diâmetro (antes da divergência folicular), pois aqueles de dois milímetros, ou menos, ainda não completaram seu desenvolvimento e síntese plena de RNA mensageiro (RNAm), além de não responderem ao estímulo do hormônio folículo-estimulante (FSH). Já folículos maiores de oito milímetros podem estar em estágio de atresia (HENDRIKSEN *et al.*, 2000). Na PIV de embriões também é possível utilizarem-se CCOs obtidos *in vivo*, por meio ou não da superestimulação ovariana e posterior aspiração folicular ovariana (OPU). Classificações morfológicas têm sido adotadas para selecionar CCOs bovinos estimados como potencialmente competentes para a MIV, os quais devem apresentar ooplasma homogêneo com granulações finas, coloração marrom e estarem completamente envolvidos por várias camadas de células do *cumulus* de forma compacta (BLONDIN; SIRARD, 1995).

A MIV de oócitos primários imaturos provenientes de fêmeas bovinas não requer necessariamente o uso de agentes estimulantes, pois estes podem ser hábeis a retomar a primeira fase da meiose após o processo físico-químico de remoção do folículo (EDWARDS, 1965). A retirada dos oócitos do ambiente folicular conseqüentemente abstém da presença de fatores ali presentes, e ativando-se muitos outros fatores intracelulares, como o promotor da fase M (MPF) e a proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), reiniciando então a meiose. É dentro deste estágio final de preparação

do oócito que ocorre a maturação nuclear, citoplasmática e molecular (GONÇALVES *et al.*, 2008). Neste evento, no núcleo celular observa-se a retomada da meiose, com condensação dos cromossomos, ruptura do envelope nuclear, até então estagnado no estágio de vesícula germinativa (VG), reorganização das redes de microtúbulos, formação dos envelopes nucleares com cromossomos homólogos e extrusão do primeiro corpúsculo polar. Já no citoplasma, há a interrupção da transcrição, redistribuição das organelas, aumento na concentração de lipídeos e distribuição dos grânulos corticais próximos à membrana plasmática (BLONDIN; SIRARD, 1995; SIRARD *et al.*, 2006; WANG; SUN, 2007). Assim, a visualização da extrusão do corpúsculo polar após 18 a 22 h pode apontar o sucesso da maturação nuclear (progressão do estágio de VG até a metáfase II, ou MII), mas o principal indicador da maturação citoplasmática e nuclear observado em laboratório ainda é a capacidade deste oócito ser fecundado, com posterior clivagem e desenvolvimento até o estágio de blastocisto. *In vitro*, após a maturação, os oócitos são mantidos em MII até a fecundação *in vivo* ou *in vitro*, ICSI, ativação partenogenética ou ainda a clonagem por TNCS.

Geralmente, espera-se que após a MIV, aproximadamente 90% dos oócitos submetidos à maturação atinjam o estágio de MII com extrusão do primeiro corpúsculo polar. Destes, 80% são fecundados e começam a se dividir, pelo menos até o estágio de duas a quatro células. No entanto, entre 41% a 80% destes embriões podem alcançar o estágio de blastocisto ou blastocisto expandido (SIRARD, 2018; PONTES *et al.*, 2009). Há evidências na literatura sugerindo que oócitos maturados *in vivo* são mais competentes no desenvolvimento do que aqueles maturados *in vitro*, tanto pela competência gradual que o oócito adquire durante o desenvolvimento folicular como pela fase do ciclo em que este foram coletados (LONERGAN *et al.*, 2001). Essa divergência de competência pode ser explicada (paralelamente aos fatores oocitários e foliculares) também por fatores epigenéticos (SIRARD, 2018; URREGO *et al.*, 2014). Heinzmann *et al.* (2011) aborda que os diferentes ambientes de maturação (*in vivo* vs. *in vitro*) alteram a expressão de genes com importância epigenética, maternalmente expressos como o *H19* e o *IGF2R*, e paternalmente como o *PEG3*, os quais foram significativamente alterados em oócitos maturados *in vitro* em comparação com oócitos maturados *in vivo*.

2.1.2. Desenvolvimento embrionário

A chamada fase embrionária nos bovinos é iniciada após a fecundação ou ativação oocitária e segue seu curso até o final da organogênese, ao redor do 42° dia de gestação (BERTOLINI *et al.*, 2007). A ativação oocitária desencadeada a partir da fecundação pelo espermatozoide leva a uma série de eventos que convertem o oócito de MII em um zigoto pronto para iniciar a embriogênese (VANDEN MEERSCHAUT *et al.*, 2014). Neste processo, há a extrusão do segundo corpúsculo polar e a metade haploide remanescente vai formar o pronúcleo feminino, o qual junto com o pronúcleo masculino, irão estabelecer o primeiro ciclo celular, completo em 20 a 30 h após a fecundação ou ativação (HYTTEL *et al.*, 2009). Dentro destes eventos, pode-se destacar o aumento transiente intracelular de Ca^{2+} , o qual será o primeiro indicador para a retomada da meiose, mas também irá desencadear a exocitose dos grânulos corticais evitando a polispermia, reorganização da membrana plasmática oocitária, recrutamento e tradução de RNAm maternos, além de atividades e reorganizações do citoesqueleto (SCHATTEN; CONSTANTINESCU, 2007). A ativação artificial também pode ser usada para produção de embriões partenogênicos que podem servir como um modelo de estudo bioquímico e morfológico de eventos que acontecem na embriogênese ou, ainda, essa ativação será uma etapa importante após a clonagem por TNCS, podendo ser realizada por meio de estímulos químicos, físicos (sendo o principal o elétrico) ou ainda mecânicos (VANDEN MEERSCHAUT *et al.*, 2014).

Continuamente, a fase embrionária pode ser subdividida em dois estágios: pré-implantação (ou estágio embrionário inicial) e implantação. O estágio de pré-implantação ainda pode subdividir-se em três: período de clivagem inicial até a ativação do genoma embrionário (dias 1 a 4); diferenciação embrionária inicial, quando ocorre a diferenciação celular, compactação, cavitação, eclosão e início da expansão (dias 4 ao 10-12); e o terceiro, com o alongamento do trofoblasto (dias 10 a 12), morfogênese e formação do disco embrionário inicial, constituição primitiva das membranas extraembrionárias iniciais e reconhecimento materno da prenhez (dias 16 a 18; BERTOLINI *et al.*, 2007).

(i) Fase embrionária de pré-implantação

O período de clivagem inicial até a ativação do genoma embrionário (dias 1 a 4) é controlado por transcritos e proteínas maternas produzidos e armazenados durante a oogênese, mas após a ativação genômica, o controle é alterado para derivados do próprio embrião. Essa ativação do genoma embrionário ocorre de forma gradual e pode ser

separada em duas fases, onde na primeira há uma transcrição muito limitada, denominada ativação menor do genoma (*minor genome activation*), podendo começar já no primeiro ciclo celular no bovino (24 h após a ativação ou fecundação – Dia 1); e a segunda denominada ativação maior do genoma (*major genome activation*), a qual decorre no quarto ciclo celular, entre 8- e 16-células (entre os dias 3 e 3.5; GRAF *et al.*, 2014). Neste período, as primeiras divisões mitóticas transcorrem sem o crescimento celular e podem até ser de forma assíncrona, pois os blastômeros estão circundados pela zona pelúcida e têm-se o aumento do número de células sem o aumento do tamanho total embrionário (clivagens embrionárias). Embriões bovinos de PIV mostram variações no tempo necessário para completar o primeiro ciclo celular, visto que já foi demonstrado por BARRETA *et al.* (2012) que um número significativamente maior de embriões derivados de zigotos que clivaram precocemente, ao redor de 26 hpf (horas após a fecundação) em comparação a embriões de clivagem tardia (38 hpf) e intermediária (32 hpf). Diante disso, zigotos que clivam mais cedo após a FIV são mais propensos a atingir o estágio de blastocisto do que aqueles seus contemporâneos de clivagem mais tardia. Ademais, os blastocistos que se formam mais cedo terão maior capacidade de seguirem seu desenvolvimento *in vivo* após a transferência para a fêmea receptora até o nascimento, com um potencial similar aos embriões produzidos *in vivo* durante o desenvolvimento (BARRETA *et al.*, 2012; LONERGAN *et al.*, 1999).

Na próxima fase embrionária inicial, entre os dias 4 e 10-12 de desenvolvimento, há a diferenciação embrionária inicial, na qual a partir do Dia 4 os blastômeros já não podem ser contados individualmente e as células formam um aglomerado sólido que lembram uma amora, por isso este estágio do desenvolvimento embrionário é chamado de mórula, palavra derivada do grego. Em seguida, as células dispostas mais externamente passam a ser mais comparadas, à semelhança a um epitélio, por efeito das junções estreitas (*tight junctions*) que alteram a permeabilidade celular, formando a mórula compacta. Em contrapartida, a população interna cria comunicações intercelulares através de junções GAP (*gaps junctions*). Pela ação das junções estreitas começa a haver acúmulo de fluido dentro do embrião via bomba ativa de sódio, concentrando íons na parte interna e causando uma concentração de fluido em torno das células internas a fim de que ocorra a formação de uma cavidade chamada blastocele. A partir desta cavidade reconhecida, no Dia 7, o embrião passa a ser chamado de blastocisto (GONÇALVES *et al.*, 2008)

O blastocisto possui visualmente as duas primeiras linhagens celulares específicas da fase de desenvolvimento embrionário inicial: as células da massa celular interna ou botão embrionário (MCI), que irão formar o embrião propriamente dito e a maiorias das membranas e sacos embrionários, e as células do trofotoderma (TE), precursoras do trofoblasto (SENGER, 2003). O exato momento e a condução do processo de diferenciação celular ainda não estão totalmente compreendidos na maioria das espécies mamíferas. Em camundongos, tem sido proposto que os dois primeiros blastômeros provenientes da primeira clivagem já têm diferentes potenciais para posteriormente formar a MCI ou o TE no estágio de blastocisto (FUJIMORI *et al.*, 2009). Além disso, muitos estudos propõem que esta diferenciação pode estar sob influência de modificações epigenéticas, como a metilação da Histona 3 (*MeH3*), e tais diferenças podem ser percebidas antes do estágio de 4-células, dependendo da orientação e ordem das clivagens que as geraram (TORRES-PADILLA *et al.*, 2007) e no estágio de blastocisto quando observou-se que a metilação global do genoma dos bovinos é menor nas células da MCI em relação ao TE (DOBBS *et al.*, 2013).

O CIV pode se estender até o sétimo dia após a FIV ou ativação oocitária, quando é realizada a seleção e avaliação dos embriões para posterior transferência a fêmeas receptoras, criopreservação, análise molecular ou observação da cinética de desenvolvimento embrionário. Com a intenção de avaliar-se a taxa de eclosão ou qualidade embrionária, o CIV pode se estender até os Dias 8 e 9 (GARCIA *et al.*, 2005). Até o estágio de blastocisto, os embriões são considerados relativamente autônomos em seu desenvolvimento, ou seja, não possuem absoluta necessidade de contato direto com o trato reprodutivo materno para que a gestação possa ser continuada, tanto que seu cultivo pode ser mimetizado *in vitro*, ou ainda, serem coletados embriões no Dia 7 de fêmeas superovuladas e serem transferidos a outras fêmeas receptoras sincronizadas, estabelecendo-se a prenhez (GEISERT; BAZER, 2015). No sétimo dia de desenvolvimento, o blastocisto deve apresentar uma proporção de células na MCI para aquelas no TE de aproximadamente 1:3. Já se determinou que o número total de células e o número de células da MCI apresentam forte correlação com a viabilidade do blastocisto e potencial estabelecimento de prenhez (GARDNER; LANE; WATSON, 2004; BARRETA *et al.*, 2012). Os indicadores morfológicos visuais de qualidade embrionária mais utilizados são os critérios publicados pela *International Embryo Transfer Society* para embriões

produzidos *in vivo*, mas que podem ser adaptados para a classificação dos de PIV (STRINGFELLOW; GIVENS, 2010). Nesta avaliação, os embriões são segregados por estágio de desenvolvimento e morfologia celular.

Existem evidentes diferenças entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* que têm sido descritas por muitos autores. Tais diferenças em embriões de PIV incluem um citoplasma mais escuro, menor densidade celular, maior concentração de lipídios, mais especificamente os triglicerídeos, uma zona pelúcida (ZP) mais frágil, diferenças na comunicação intercelular e uma incidência de anormalidades cromossômicas (PONTES *et al.*, 2009). Todos estes fatores, principalmente a concentração de lipídios, irão colaborar para a maior sensibilidade à criopreservação apresentadas pelos embriões provenientes de PIV (PONTES *et al.*, 2009)

Quando o blastocisto continua seu desenvolvimento nos Dias 8 e 9 por via de mitoses sequenciais, a pressão interna aumenta pelo crescimento da blastocele embrionária, exercendo uma ação mecânica para que ocorra a eclosão. Este processo é necessário para que o embrião continue seu desenvolvimento de forma expandida e alcance a terceira fase da pré-implantação, com o alongamento do trofoblasto (Dias 10 a 12), morfogênese e formação do disco embrionário inicial, formação primitiva das membranas extraembrionárias iniciais e reconhecimento materno da prenhez (Dias 16 a 18) (BERTOLINI *et al.*, 2002a). Embora o embrião bovino no dia 5 de desenvolvimento chegue ao útero, será após a eclosão que se instituirá uma fase de crescimento e diferenciação dependente do ambiente uterino para seguir o desenvolvimento. Esse crescimento inicial após a eclosão levará à diferenciação da MCI em duas linhagens celulares: o hipoblasto e o epiblasto (SENGER, 2003). Aquelas células que ficam à frente da cavidade embrionária tomarão forma mais achatada para compor o hipoblasto, e aquelas remanescentes mais internas formam o epiblasto. Posteriormente, durante a gastrulação, o epiblasto se diferencia em três linhagens embrionárias: o ectoderma, o mesoderma e o endoderma, os quais darão origem ao disco embrionário propriamente dito, e a partir da proliferação ventral formada pelas células do endoderma extra-embriônico, derivado do hipoblasto, cobrindo a blastocele internamente, forma-se o saco vitelínico primitivo ou primário. Também derivado do hipoblasto, há uma evaginação do mesoderma extra-embriônico, que superiormente em direção ao polo embrionário formará o âmnio ao redor do disco extra-embriônico e, ventralmente, afasta o endoderma extra-embriônico do

trofocotoderma, agora já trofoblasto, para formar o saco vitelínico secundário. O saco vitelínico será uma membrana extraembrionária transiente que regressará conforme o embrião cresce, mas será essencial para suporte do desenvolvimento até a placentação. Uma vez o disco embrionário estar formado, o trofoblasto junto com o mesoderma extraembrionário reformulam-se a fim de que o embrião siga o processo de alongamento tomando forma tubular e posteriormente filamentosa. Esse alongamento no 15º dia de desenvolvimento, em forma filamentosa, ocupa internamente o corno uterino, sendo este um ponto crítico para a secreção de interferon tau (IFN- τ), regulando o desenvolvimento, e principalmente, a sinalização da prenhez e a subsequente implantação (GEISERT; BAZER, 2015). A sinalização e o reconhecimento materno da prenhez fazem parte da terceira fase de pré-implantação, entre os Dias 16 e 18, onde o concepto sinaliza sua presença no sistema reprodutivo materno para a instauração da prenhez. Esta é uma fase crítica que envolve a supressão do mecanismo endometrial de luteólise ovariana a fim de manter-se a secreção de progesterona (P4) pelo corpo lúteo (CL; GEISERT; BAZER, 2015). As células do TE e posteriormente do trofoblasto produzirão IFN- τ desde o estágio de blastocisto (BERTOLINI *et al.*, 2002a), proteína com ação nas células do endométrio, inibindo a produção de receptores de ocitocina a fim de que a ocitocina lútea não desencadeie o mecanismo de *feedback* positivo com a prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}) e consequente luteólise (GEISERT; BAZER, 2015). Além disso, a maioria das transcrições endometriais ocorrem em resposta ao aumento do IFN- τ secretado pelo concepto filamentoso, com tais proteínas produzidas no lúmen uterino servindo para preparar o ambiente para receber o embrião e iniciar a fase de implantação (BERTOLINI *et al.*, 2007; GEISERT; BAZER, 2015). A P4 produzida pelo CL ao longo desta fase inicial de desenvolvimento também desempenha um papel importante na regulação endometrial de secreções que estimulam e modulam o crescimento e diferenciação do concepto. Muitos estudos associam a elevada concentração de P4 com um acelerado crescimento do concepto, e conceptos mais desenvolvidos são candidatos a produzir mais IFN- τ (GEISERT; BAZER, 2015). No entanto, tratamentos com suplementação de P4 após a IA são controversos, pois indicam, nos melhores dos resultados, uma modesta resposta positiva a esta hipótese (YAN *et al.*, 2016).

(ii) Fase embrionária de implantação

O segundo estágio da fase embrionária será o de implantação, o qual ocorrerá de forma gradual e contínua, um processo dividido em três eventos consecutivos: pré-contato

(Dia 17), aposição (Dias 18 a 19) e adesão (iniciando em torno do Dia 22). O mecanismo de aposição do concepto envolve a expansão do alantóide dentro da membrana coriônica promovendo a extensão do corionalantóide ao longo dos cornos uterinos, que, juntamente com aumento no líquido do alantóide intensificam a aposição das membranas ao endométrio e levam vasos sanguíneos desde o embrião *per se*. Esta aposição é facilitada com a interdigitação entre projeções citoplasmáticas das membranas e microvilosidades epiteliais uterinas para que após o Dia 19 o concepto esteja pronto para sua adesão final ao epitélio e placentação (GEISERT; BAZER, 2015). Para tanto, o concepto já está igualmente distribuído entre os cornos uterinos com o máximo de área de contato entre mãe e concepto possíveis (HYTTEL *et al.*, 2009). A placentação e a organogênese serão os maiores eventos que ocorrem durante o período de implantação, e falhas em algum ou ambos podem ser letais, principalmente nesta “janela fisiológica” no qual o tempo de desenvolvimento do contato embrio-materno é vital e deve ser completo em um período curto (entre os Dias 17 e 35; BERTOLINI *et al.*, 2007).

A placenta é considerada um organismo endócrino transiente que após totalmente formada possuirá um componente fetal derivado do córion, chamado cotilédone, e um componente materno através de modificações do endométrio uterino, denominado carúncula, onde o ponto de junção entre eles chama-se placentônio (SENGER, 2003). Os placentônios possuem abundante circulação sanguínea, e ao longo de toda a comunicação corion-endométrio, há entre 75 e 120 unidades, proporcionando um vasto aumento da área necessária para a contínua troca de substâncias entre a mãe e o concepto (PETER, 2013). Aos 30 dias de gestação, cotilédones primitivos já aparecem em regiões de justaposição mãe/concepto com as carúnculas. No Dia 33, cones trofoblásticos formam vilosidades que penetram nas criptas carunculares, formando ramos laterais que, a partir do 45º dia, criptas e vilosidades já são facilmente reconhecidas. A partir daí é reconhecida como a fase fetal da gestação, a qual se estende do Dia 42 até o nascimento.

2.1.3. Fase fetal

Na fase fetal, o conceito propriamente dito passa a ser denominado de feto e já lembra morfológicamente a espécie, gênero ou família, compreendendo em bovinos do 42º dia de desenvolvimento até o nascimento. Neste início, a placenta está propriamente formada, com os placentônios evoluindo e aumentando em massa para prover o suporte ao crescimento fetal. Já a proporção entre órgãos fetais individuais e o peso fetal total muda consideravelmente. O número máximo de placentônios já pode ser observado até o final do primeiro trimestre de prenhez, com alterações subsequentes somente no seu tamanho ao longo da prenhez de acordo com a demanda de suprimento ao conceito. São os grandes aumentos nas trocas placentárias de nutrientes e resíduos que suportam o exponencial crescimento fetal durante a última metade do período de gestação. Tudo isso se deve principalmente ao rápido crescimento da vascularização útero-placentária (LEMLEY; VONNAHME, 2017; REYNOLDS; REDMER, 1995, 2001) e para tal, a partir dos 90 aos 180 dias de gestação, o diâmetro médio das artérias pedunculares e arteríolas carunculares aumenta em aproximadamente 50% (REYNOLDS; REDMER, 2001).

A principal função da placenta então será promover as trocas substanciais entre a mãe e o feto para que seja suficiente ao desenvolvimento do descendente. Tais trocas intermediadas pelos placentônios envolvem mecanismos de difusão simples (gases e água); difusão facilitada (glicose, aminoácidos e outros elementos importantes metabolicamente); e transporte ativo (bomba de sódio e potássio e de cálcio; SENGER, 2003; FERRELL, 1989). A glicose será o maior precursor de energia para o feto, sendo derivada da circulação materna, a qual terá seu pico de demanda no final da gestação em função do tamanho e crescimento do feto. Então, a placenta cotiledonária nos bovinos servirá para comunicações metabólicas entre mãe e feto e produção hormonal, todos importantes para o desenvolvimento fetal (SENGER, 2003). No entanto, uma função placentária comprometida pode resultar em restrição ao crescimento fetal ou, ainda, crescimento exagerado, os quais estão associados a riscos de morbidade e mortalidade neonatal (LEMLEY; VONNAHME, 2017). Assim, uma placenta insuficiente, além de levar a um baixo crescimento fetal, gerará muitas perdas subsequentes na produção animal, pois as crias representam a próxima geração de animais produtores de carne, leite e genética (WU *et al.*, 2006).

O crescimento fetal ocorre lentamente durante as fases iniciais de desenvolvimento gestacional e exponencialmente durante as fases posteriores (ELEY *et al.*, 1978; PRIOR & LASTER, 1979; FERRELL, 1989; REYNOLDS *et al.*, 1990), com aproximadamente 90% do peso fetal a termo adquirido durante o último trimestre da gestação (FERRELL, 1989). No entanto, a placenta cresce mais rapidamente do que o feto no início da gestação, com o peso placentário sendo maior do que o peso fetal durante o primeiro trimestre da gestação, invertendo-se a taxa de crescimento nos demais períodos de desenvolvimento. Quando chega-se no terceiro trimestre da gestação, o crescimento fetal é normalmente limitado por fatores maternos e placentários, um mecanismo homeostático fisiológico que garante a sobrevivência materna (FERRELL, 1991; GLUCKMAN *et al.*, 1992). Como a maioria dos nutrientes transferidos através da placenta são metabolizados e/ou produzidos pela mesma (FERRELL *et al.*, 1983; FERRELL, 1989), distúrbios na placentação e na função da placenta podem levar a alterações no padrão de crescimento fetal (SCHLÄFER *et al.*, 2000). Isto não é surpreendente, uma vez que o tecido placentário geralmente demonstra um elevado grau de plasticidade sob condições desfavoráveis, por expressar mecanismos para adaptar-se as adversidades nutricionais (PERRY *et al.*, 1999) e do ambiente (FERRELL, 1989; KREBS *et al.*, 1997), que podem promover mudanças morfo-histológicas na placenta para modular o crescimento fetal, num padrão como o observado após manipulações *in vitro* de embriões pela FIV e clonagem por TNCS. Hipóteses recentes têm associado a placentação atípica com anomalias fetais vistas do início da gestação até o nascimento. Na verdade, as associações entre defeitos da placenta e desenvolvimento fetal anormal no início (BERTOLINI *et al.*, 2002a; HILL *et al.*, 1999) e no final da gestação (CIBELLI *et al.*, 1998; HILL *et al.*, 1999, 2001; BERTOLINI *et al.*, 2000, 2002a; FARIN *et al.*, 2010) de conceptos PIV por FIV e por clonagem por TNCS parecem desempenhar um papel metabólico chave na ocorrência de excesso de peso ao nascimento e baixa sobrevivência pós-natal (BEHBOODI *et al.*, 1995; BERTOLINI *et al.*, 2002a; BATCHELDER *et al.*, 2005).

2.2. Problemas de desenvolvimento relacionados à PIV de embriões bovinos

Dentro das TRAs, as técnicas de FIV e clonagem têm sido muito importantes como ferramentas para estudos científicos, principalmente após o nascimento da ovelha Dolly pela técnica de clonagem por TNCS (Wilmut *et al.*, 1997). Além disto, tais métodos de PIV

de embriões vêm ganhando força comercialmente, como para a conservação e propagação de animais de destaque comercial e genético. No entanto, após o advento destas manipulações *in vitro*, consequências inesperadas e imprevisíveis de desenvolvimento pré- e pós-natal se tornaram evidentes, com as principais consequências estando associadas a anormalidades de desenvolvimento que podem resultar em aumento nas taxas de perdas embrionárias e fetais, hidropsia nas membranas fetais, gestação prolongada, problemas imunológicos, nascimentos de animais excessivamente grandes, alterações placentárias e disfunções sistêmicas e clínicas que levam a uma baixa sobrevivência pós-natal (BERTOLINI *et al.*, 2007; MIGLINO *et al.*, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2017)

Em 2006, Farin e colaboradores (FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006) publicaram um interessante sistema de classificação para prenhez derivadas de embriões de PIV com base nos resultados de desenvolvimento do conceito, a partir do grau dos fenótipos anormais. A classificação se estende do I a IV, onde no Tipo I se encaixam ocorrências de anormalidades graves, com mortalidade embrionária precoce ou tardia; de Tipo II incluem as mortalidades de conceito e aborto durante a fase fetal; no Tipo III são anormalidades compatíveis com um parto, mas que acabam gerando morte logo após o parto; e a última, Tipo IV, ocorre quando as anormalidades são moderadas e compatíveis com o parto e sobrevivência pós-natal normal ou anormal. Bertolini *et al.* (2007) sugeriram que uma categoria adicional fosse incluída, a Tipo V, compreendendo o período juvenil a adulto, uma vez que mais de 8% dos animais clonados morrem antes de atingir os quatro anos de idade (WELLS *et al.*, 2004).

2.2.1. Período pré-natal

As anormalidades de desenvolvimento em embriões bovinos de PIV podem resultar em um aumento nas taxas de perdas embrionárias desde os primeiros 16 dias pós-fecundação, durante o período crítico de reconhecimento materno da prenhez, com retorno à ciclicidade em ciclo regular (18 a 24 dias), chamada mortalidade embrionária precoce ou inicial, ou ainda mais tardia, entre os dias 25 e 35 de gestação, depois do reconhecimento materno, com retorno à ciclicidade em ciclo irregular, denominada mortalidade embrionária tardia (BERTOLINI *et al.*, 2002b, 2007; DISKIN *et al.*, 2016). Alterações fenotípicas de tamanho são os principais achados de estudos durante esta fase de desenvolvimento embrionário e fetal, onde um padrão bifásico de crescimento do embrião/feto ocorre, com o

subdesenvolvimento nas fases embrionárias e fetal inicial, e aumentado (como de forma compensatória) no final da gestação. Além dos conceptos serem menores no início, anormalidades que ocorrem durante o desenvolvimento das membranas extraembrionárias e da placenta podem ser restritivos ao crescimento fetal.

Estudos com embriões e fetos produzidos por FIV e por clonagem por TNCS demonstram conceptos menores no estágio inicial de implantação em relação aos controles temporais produzidos *in vivo* (BERTOLINI *et al.*, 2002b; CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2006). Desta forma, Bertolini *et al.* (2002b) demonstraram este subdesenvolvimento no 16º dia de embriões de PIV, com discos embrionários e trofoblastos menores linearmente. Neste estágio de alongamento, um fenótipo de subdesenvolvimento de tais estruturas pode levar à falha no bloqueio da liberação de $PGF_{2\alpha}$ endometrial, o qual é elementar ao reconhecimento materno da prenhez. A hipótese de que uma condição subótima na PIV seja crucial para esse retardo no crescimento e consequente morte embrionária é muito considerada, aceita e estudada (BERTOLINI *et al.*, 2002a, 2002b, 2004), porém, há outros estudos com hipóteses não relacionadas ao tamanho embrionário e fetal e sim mostrando a expressão de antígenos de superfície do tipo MHC-I nas células do trofoblasto de conceptos produzidos por TNCS que acabam levando à rejeição materna ao concepto derivado da clonagem por TNCS (HILL *et al.*, 2002). Os autores sugerem que esta expressão de MHC-I no início da prenhez seja causada por problemas na reprogramação do genoma após a TNCS, com uma expressão persistente desde a reconstrução com a célula doadora ou pela ativação gênica no *loci* do MHC-I no trofoblasto durante o desenvolvimento embrionário, o qual deveria ser desprovido de antígeno de superfície na maior parte da gestação (ELLIS, 2004; HILL *et al.*, 2002).

A fase de placentação também representa um momento de perdas gestacionais, onde há uma espécie de janela biológica durante a aposição embrionária e a placentação. Um subdesenvolvimento embrionário e das membranas extraembrionárias podem atrasar este processo, pois as taxas de perdas de conceptos bovinos derivados da clonagem ou de FIV são no geral maiores depois dos 30 dias de gestação. Temporalmente estes eventos coincidem com a involução do saco vitelínico (o qual garante a sobrevivência embrionária até então) e falhas na substituição do aporte nutricional pela placenta, levando à desnutrição, hipóxia e acúmulo de metabólitos pelo embrião e, consequentemente, morte (BATCHELDER *et al.*, 2007; BERTOLINI *et al.*, 2002a; HILL *et al.*, 2002). Outros

estudos também apontam que problemas epigenéticos em embriões clones derivados de TNCS acabam afetando o desenvolvimento do tecido extraembrionário e da placentação (JOUNEAU *et al.*, 2006; WAKISAKA-SAITO *et al.*, 2006). Ainda que o feto consiga seguir seu desenvolvimento após esta fase crítica, insuficiências placentárias em prenhez de clones oriundas de TNCS levam a mortes tardias e abortos, como encontradas por Miglino *et al.* (2007) no terceiro trimestre de gestação, causadas por hidroalantóide e hidropsia fetal. Em nível molecular, sabe-se que a expressão gênica está alterada neste tipo de embrião, no qual os genes de *imprinting*, que são críticos para a diferenciação da placenta e para o desenvolvimento precoce na pré-implantação, são expressos aberrantemente em uma proporção dos blastocistos clonados. Isso é provavelmente atribuído à reprogramação incompleta do genoma da célula doadora, e a identificação de tais genes aberrantemente expressos durante a prenhez é importante para estudos de manipulação gênica, por exemplo (HALL; RUDDOCK; FRENCH, 2005).

2.2.2. Período pós-natal

As gestações de embriões PIV que avançam no desenvolvimento e chegam a termo também podem apresentar anomalias peri- e pós-natais, como maior peso placentário, aumento do tamanho dos placentônios, membranas fetais edematosas e aumento do diâmetro do cordão umbilical, podendo estar presentes desde o terceiro trimestre de prenhez (BERTOLINI *et al.*, 2002b) até o nascimento dos conceptos (MIGLINO *et al.*, 2007). Entretanto, anormalidades de desenvolvimento causadas mais especificamente pelas tecnologias reprodutivas de FIV e clonagem por TNCS podem interferir com o padrão de crescimento fetal e placentário, podendo resultar em um conjunto de sintomas denominado em inglês de *Abnormal Offspring Syndrome (AOS)*, a qual inclui crescimento fetal acelerado e aumento do peso ao nascimento, anormalidades anatômicas, fisiológicas e metabólicas, e a redução da sobrevivência neonatal. A etiologia da *AOS* tem sido associada com o aumento na concentração e proporção de certos monossacarídeos (glicose e frutose) no plasma fetal e neonatal e fluidos placentários, o qual pode ser uma consequência de mudanças na função placentária (BERTOLINI *et al.*, 2004). De fato, o desenvolvimento de conceptos derivados de embriões bovinos de PIV tem mostrado estar associado com o padrão de crescimento bifásico, com o retardo de crescimento inicial no qual coincide com o período de placentação, seguido de um crescimento acelerado fetal e placentário na

metade para o final da gestação (BATCHELDER *et al.*, 2007; BERTOLINI *et al.*, 2002a, 2004; GERGER *et al.*, 2017). Não obstante, informações detalhadas da função placentária e perfil metabólico de prenhez bovinas por embriões PIV ainda são limitadas. Condições de cultivo embrionário *in vitro*, incluindo a presença de soro sanguíneo no meio de cultivo, cultivo embrionário com presença de células de suporte e/ou falhas na reprogramação epigenética após a clonagem por TNCS também têm sido implicados na ocorrência da AOS (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2012). Em embriões ovinos, a diminuição da expressão do gene *IGF2* leva à perda da metilação em seu controle *imprinting* (NEILL, 2001).

Desta forma, a baixa eficiência da clonagem com a incompleta reprogramação do núcleo da célula doadora, a qual leva à expressão anormal de genes importantes para o desenvolvimento, pode levar embriões clonados a apresentar expressão anormal de genes embrionários (SAWAI, 2009). Apesar disso, o rumo dos eventos que seguem o desenvolvimento de um embrião de PIV viável, mas epigeneticamente afetado, do início ao final da gestação, parece interferir com a função placentária e o metabolismo dos conceitos sem comprometer a homeostase de forma letal (BERTOLINI *et al.*, 2002a, 2007). Mesmo assim, os mecanismos fisiológicos, metabólicos e/ou moleculares que levam à AOS, definida no estágio embrionário inicial e manifestada durante e depois da gestação, continuam ainda desconhecidos (GERGER *et al.*, 2017). Em estudos prévios de Bertolini e colaboradores (BERTOLINI *et al.*, 2002b, 2004; GERGER *et al.*, 2016, 2017), foi observado que o crescimento de fetos produzidos pela FIV e pela clonagem por transferência nuclear pela técnica de clonagem manual (TN-HMC) foram caracterizados por um padrão de crescimento bifásico, reestabelecendo o tamanho dos fetos já no final do primeiro trimestre de prenhez, culminando com grande peso fetal, placentário e uterino ao final do terceiro trimestre de prenhez. Isso acaba levando a alterações morfológicas significativas na placenta e produzindo neonatos com excessivo peso e reduzida sobrevivência pós-natal (BATCHELDER *et al.*, 2007; BERTOLINI & ANDERSON, 2002; GERGER *et al.*, 2017). O padrão excessivo de crescimento fetal observado do meio para o final da gestação parece estar associado com o aumento da absorção de substratos energéticos, especialmente a glicose, através dos tecidos útero-placentário-fetal (BERTOLINI *et al.*, 2004).

Ainda que haja sucesso no parto, mortes e problemas no desenvolvimento peri- e pós-natais também são muito comuns em bovinos provenientes de PIV, especialmente pela

clonagem, frequentemente associados com problemas de adaptação à vida *ex útero*. Alguns recém-nascidos clonados parecem não exercer um controle efetivo sobre seu metabolismo energético durante as primeiras 24 h de vida *ex utero*, o que está associado à fraqueza pós-natal, hipóxia por hipertensão pulmonar, hipo- ou hipertermia, acidose metabólica e morte (BATCHELDER *et al.*, 2007; CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2006; HILL *et al.*, 1999; WELLS *et al.*, 2004). Desta forma, problemas clínicos, mortalidades no periparto e uma tendência de reduzida vida saudável em clones produzidos pela clonagem por TNCS, com altas taxas de morbidade e mortalidade durante os primeiros meses de vida, já foram bem descritos e revisados nas últimas duas décadas (HILL *et al.*, 1999; JOUNEAU *et al.*, 2006; WELLS *et al.*, 2004), apesar de não estarem definidos os mecanismos de causa-e-efeito. Além de bovinos, outras espécies têm demonstrado problemas pós-natais similares, como os apresentados em ovinos (LOI *et al.*, 2006) e caprinos (MARTINS *et al.*, 2016), porém com menor frequência de ocorrência.

2.3. *Imprinting* genômico

Nos animais de reprodução sexuada, há duas cópias de cada gene, uma herdada do cromossomo materno e outra do paterno, dispendo a mesma função, com normalmente somente um dos alelos sendo expresso após a diferenciação celular e ativação gênica, que pode ocorrer de forma relativamente aleatória (AIGNER *et al.*, 1999). No entanto, existem alguns genes que são funcionalmente haploides, onde a atividade transcricional de cada alelo vai ser determinada pela linha germinal que o origina, se do alelo materno ou paterno. Esses genes são chamados de *imprinting*, no qual já foram identificados mais de 200 (Catálogo dos genes *Imprinting* www.otago.ac.nz/IGC), sendo todos em animais eutérios, ou seja, os mamíferos que possuem placenta verdadeira (WOOD; OAKEY, 2006). Os genes *imprinting* são tecido-específicos e espécie-dependentes, sendo regulados ao longo do desenvolvimento. Um exemplo é o gene *IGF2*, com *imprinting* paterno nos tecidos fetais, mas bialélico no cérebro e não *imprinting* no tecido hepático fetal, além de ser também diferencialmente expresso entre as espécies (WOOD; OAKEY, 2006). Os genes *imprinting* estão envolvidos de forma geral no desenvolvimento embrionário, regulação do crescimento fetal, função placentária e sobrevivência pós-natal (LIU *et al.*, 2008) e a importância deste grupo de genes é evidenciada pela falha do desenvolvimento de embriões com as duas cópias de cromossomos do mesmo genitor, denominados ginogenotos

(maternos) ou androgenotos (paternos; BARTON; SURANI; NORRIS, 1984; SURANI; BARTON, 1983).

A maneira como os cromossomos materno e paterno diferem, permitindo um padrão de expressão distinto ao longo do desenvolvimento, passou a ficar mais clara após estudos de modificações epigenéticas, os quais são responsáveis principalmente por diferenças na expressão gênica, dada pela metilação do DNA. Os eventos epigenéticos que acontecem no desenvolvimento inicial embrionário serão decisivos para a expressão de genes e determinação de algumas linhagens celulares específicas, e através disso acredita-se que a metilação geral do DNA é o maior fator para determinação de um *imprinting* genômico (HEINZMANN *et al.*, 2011; O'DOHERTY *et al.*, 2015; WOOD; OAKEY, 2006). Existem algumas regiões no genoma chamadas regiões diferencialmente metiladas (DMRs) que estão envolvidas nesta regulação de transcrição, e os genes *imprinting* estão dispostos em grupos exatamente nestas DMRs. Em camundongos, já se identificou que mais da metade dos *imprintings* encontram-se no cromossomo 7, inclusive o acima exemplificado (*IGF2*). Os padrões de metilação do DNA necessários para o *imprinting* estão sujeitos a uma dinâmica na reprogramação, de forma que são estabelecidos em diferentes momentos ao longo do desenvolvimento, dependendo de qual origem (materna ou paterna) eles são transmitidos (O'DOHERTY *et al.*, 2015).

O *cluster* que contém o gene *IGF2* também tem outros dois genes *imprinting*: a insulina-2 (paternalmente expresso no saco vitelínico embrionário), o *IGF2* (expresso pelo cromossomo paterno), e o gene *H19* (RNA não codificado, maternamente expresso), posicionados nesta ordem. Este *cluster* mantém-se altamente conservado dentre as espécies de mamíferos, exceto por pequenas modificações, estando no cromossomo 7 em camundongos (BARTOLOMEI *et al.*, 1993), cromossomo 11 em humanos (BRISSENDEN; ULLRICH; FRANCKE, 1984), cromossomo 2 em suínos (NEZER *et al.*, 1999), cromossomo 21 em ovinos (ANSARI *et al.*, 1994) e cromossomo 29 em bovinos (GOODALL; SCHMUTZ, 2003). No total, quatro diferentes promotores foram encontrados para o controle da expressão do gene *IGF2* em muitas das espécies em estudo. Tal variação permite uma produção temporal e espacial diferencial em cada tecido e durante estágios distintos de desenvolvimento para as isoformas de RNAm de *IGF2*.

2.3.1. Teoria do conflito parental: um cabo-de-guerra biológico

Várias teorias foram surgindo ao longo do tempo para explicar o fenômeno de evolução do *imprinting* genômico em mamíferos, e na maioria delas há a concordância de que a gestação placentária favoreceu sua evolução devido ao aporte nutricional do embrião diretamente do organismo materno (MOORE; HAIG, 1991). Dessa forma, a “teoria do conflito parental” explica que o *imprinting* genômico é uma consequência da viviparidade, um resultado da evolução da placentação (WOOD; OAKEY, 2006). Acredita-se que a placenta especificamente seja o tecido mais afetado pela força da teoria do conflito paterno e materno, tanto que todos os genes são *imprinting* na placenta, mas expressos pelos dois alelos nas linhagens celulares somáticas do feto (WOOD; OAKEY, 2006). A quantidade de troca de nutrientes entre mãe e feto via placenta precisa ser regulada durante o desenvolvimento, tal que a falha nesta regulação tem um efeito notável tanto para o embrião como para a mãe. Desta forma, as repressões capazes de desacelerar o aporte de nutrientes ao feto podem preservar a própria saúde reprodutiva e homeostase metabólica da mãe, favorecendo as gestações subsequentes e aumentando o número de descendentes. Em contrapartida, a progênie oriunda de machos que são capazes de exigir um maior aporte de nutrientes durante a gestação leva a uma vantagem em perpetuar o material genético paterno, com o nascimento de animais maiores que os irmãos (MOORE; HAIG, 1991). Portanto, a seleção de mamíferos favoreceu um conjunto de genes com expressão de alelos distintos inclinada no interesse parental com base na origem parental do cromossomo.

O *IGF2* e seu receptor *IGF2R* são um exemplo típico desse conflito parental, pois são genes *imprinting* expressos pelo cromossomo paterno e materno, respectivamente, com o *IGF2*, de origem paterna, estando envolvido no crescimento embrionário e fetal, com função pleiotrópica e de diferenciação de células e tecidos, enquanto que o *IGF2R*, de origem materna, sequestra e elimina o *IGF2* circulante (BAKER *et al.*, 1993; DECHIARA; ROBERTSON; EFSTRATIADIS, 1991). Então, uma associação dentro da função de regulação e atividade alélica pode ser feita, onde uma promoção do crescimento pode ser atribuída a uma expressão paterna do *IGF2*, enquanto a expressão materna de *IGF2R* leva ao atraso no desenvolvimento. Essa tendência é ainda mais notória nas quimeras androgenotas, cujos músculos são hipertróficos, enquanto as quimeras ginogenotas têm um desenvolvimento muscular atrófico (SURANI; BARTON, 1983). Após evidenciar-se que o nível fisiológico do *IGF2* está relacionado de forma direta com o crescimento embrionário,

posteriormente passaram a ser relatados genes da família do *IGF* expressos de forma anômala em conceptos bovinos provenientes de FIV e de clonagem por TNCS, os quais apresentam atraso no desenvolvimento inicial e posterior desregulação no crescimento (MOORE *et al.*, 2007). Para tal, o impacto da família *IGF* no crescimento e desenvolvimento fetal e placentário é um dos aspectos mais estudados dessa família em particular, e serão discutidos abaixo.

2.3.2. Sistema *IGF*

2.3.2.1. Ligantes, receptores e proteínas de ligação

Fatores de crescimento semelhantes à insulina são polipeptídios do tipo pró-insulina que atuam nos níveis endócrino, parácrino e autócrino para induzir efeitos mitogênicos e metabólicos. Os *IGFs* são genes que não estão restritos somente à produção e secreção por tipos celulares específicos, visto que quase todos os tipos de células no organismo podem expressar *IGFs* em certa quantidade (HOLZENBERGER *et al.*, 2003). Em nível celular, a sinalização destes pode causar uma série de respostas biológicas, tais como crescimento, proliferação, sobrevivência, absorção de nutrientes, migração e diferenciação (BAKER *et al.*, 1993; CONSTANCIA *et al.*, 2002; DECHIARA; ROBERTSON; EFSTRATIADIS, 1991; PAVELIC; MATIJEVIC; KNEZEVIC, 2007). Deste modo, este sistema desempenha um papel importante na regulação do crescimento em todos os vertebrados. Esta atividade é mediada pela interação de dois ligantes (*IGF1* e *IGF2*) com três receptores de membrana (*IGF1R*, *IGF2R*, e receptor de insulina, IR), embora a maioria de seus efeitos sejam mediados pelo *IGF1R*. Além disso, o transporte, a meia-vida e as funções são modulados pela interação com seis proteínas sanguíneas de ligação ao *IGF*, as *IGFBPs*, presentes em vários fluidos extracelulares em diferentes proporções. A resposta específica deste sistema é dependente do tecido, proporção entre os receptores, proteínas de ligação, proteases específicas que modificam certas *IGFBPs*, entre outros (FIRTH; BAXTER, 2002). No entanto, o impacto da família *IGF* no crescimento e desenvolvimento fetal e placentário é um dos aspectos mais estudados desta família em particular.

Em bovinos, as pró-proteínas do *IGF1* e *IGF2* possuem 154 e 173 aminoácidos, respectivamente (NCBI *Reference Sequence*: NP_001071296.1; AAI16040.1). Os *IGFs* também possuem quatro domínios bioquímicos distintos, chamados B-C-A-D, onde os

domínios A e B são similares à insulina, com 49% de homologia, e o domínio D distingue a família da pró-insulina. Ambos os ligantes são sintetizados como pré-pró-hormônios e direcionados para a secreção por peptídeos sinais hidrofóbicos. No aparelho de Golgi, ocorre uma remoção proteolítica do peptídeo sinal contendo extensões de terminal carboxila (domínios E) de 25 (pró-*IGF-1*) e 89 (pró-*IGF-2*) aminoácidos, para gerar os quatro aminoácidos maduros dos peptídeos de cada domínio do IGF (HOLZENBERGER *et al.*, 2003; WOOD; OAKEY, 2006). Embora o ligante *IGF1* tenha sido inicialmente considerado como de síntese e secreção exclusiva do fígado (pela regulação de GH – Hormônio do crescimento - através de um *feedback* negativo), atualmente estudos em camundongos demonstraram que quando cessada a produção específica pelo fígado, há uma redução de 75% do ligante *IGF1* circulando pelo sangue, caracterizando uma distribuição mais esparsa e produção por tecidos não-hepáticos. Além disso, já foi estabelecido que a síntese e secreção de *IGF1* é independente de GH durante o desenvolvimento inicial, que pode se estender a órgãos específicos durante o desenvolvimento posterior, enquanto o crescimento pós-natal é dependente de GH, e por sua vez, do *IGF1* (LE ROITH; SCAVO; BUTLER, 2001). Já o ligante *IGF2* tem característica mitogênica e é altamente expresso durante o desenvolvimento embrionário e fetal, onde a sua importância pós-natal parece ser espécie-dependente, não havendo interferência em camundongos, mas sendo necessário em humanos. A atividade *imprinting* do *IGF2*, originada da expressão do alelo paterno, possui síntese e expressão independente da regulação do GH, e mostra importante papel no desenvolvimento do trofoblasto e funcionalidade na ligação embrio-materna (CONSTANCIA *et al.*, 2002; DECHIARA; ROBERTSON; EFSTRATIADIS, 1991; PAVELIC; MATIJEVIC; KNEZEVIC, 2007).

As repostas biológicas do sistema *IGF* podem ser classificadas como metabólicas e anabólicas. Elas incluem estímulos para absorção de glicose e oxidação, síntese de glicogênio, absorção de aminoácidos e lipogênese, proliferação celular, migração celular endotelial, síntese de proteínas e ácidos nucleicos e supressão de degradação de proteínas, atribuídas principalmente ao *IGF1R*, embora alguma atividade biológica possa ser atribuída através da interação com o receptor de insulina (OWENS, 1991; GLUCKMAN *et al.*, 1992; RAPOLEE *et al.*, 1992; LIU *et al.*, 1994; ZUMKELLER *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2006). Além disso, um efeito indireto no crescimento fetal pode ser observado na capacidade do *IGF* em afetar a estrutura e função da placenta e, assim, influenciar a

disponibilidade de nutrientes. Ambos os ligantes parecem regular o crescimento fetal (onde nenhum pode compensar completamente a ausência do outro, indicando funções não redundantes). Suas altas concentrações em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como suas consequências de alterações, destacam alguma especificidade: o crescimento pós-natal parece amplamente relacionado ao *IGF1*, pois o nanismo persiste em camundongos após o nascimento quando esse gene específico é eliminado e o tamanho normal é alcançado na idade adulta. Já a ausência de *IGF2* determina principalmente o retardo de crescimento pré-natal, como demonstrado pela alta concentração nos tecidos fetais, com a insuficiência placentária resultando em perda de função (BAKER *et al.*, 1993; CONSTANCIA *et al.*, 2002; DECHIARA; ROBERTSON; EFSTRATIADIS, 1991; PAVELIC; MATIJEVIC; KNEZEVIC, 2007).

Como já mencionado, há basicamente dois receptores responsáveis pela maioria das ações do sistema *IGF*, o *IGF1R* e o *IGF2R*. O *IGF1R* é um receptor de transmembrana sendo o principal mediador da via de sinalização do *IGF*. O *IGF1R* é pós-traducionalmente modificado pela eliminação de 30 peptídeos e dividido em dois conjuntos de subunidades, alfa e beta, ligados por pontes de dissulfeto para formar uma glicoproteína heterotetrâmica, com uma homologia de 70% com o IR. As subunidades alfa são domínios extracelulares diretamente associadas com o ligante, enquanto que a beta são subunidades de transmembrana responsáveis pela resposta catalítica intracelular. Quando os ligantes se ligam ao *IGF1R*, ocorre uma mudança de conformação resultando em autofosforilação do receptor e ativação da atividade da tirosina quinase. A subsequente fosforilação da tirosina de substratos específicos estimula várias cascatas intracelulares, entre elas duas importantes vias: MAP quinase ERK1/2 e fosfatidilinositol-3-OH quinase/akt quinase, com cada via dependendo do tipo de célula (HOLZENBERGER *et al.*, 2003; PAVELIC; MATIJEVIC; KNEZEVIC, 2007). Embora ocorra essa semelhança estrutural com o IR, já tem sido demonstrado que o *IGF1R* exibe uma afinidade de 100 a 1.000 vezes maior com o seu ligante quando comparado ao da insulina.

O segundo receptor atuando na família *IGF* é o *IGF2R*. Devido a suas características idênticas ao receptor cátion-dependente manose 6-fostato, o *IGF2R* também pode ser chamado por ambos os nomes. O receptor também surge de um gene *imprinting*, maternalmente expresso, e paternalmente reprimido (BARLOW *et al.*, 1991). Basicamente, o *IGF2R* é um receptor de transmembrana monomérico, associado com marcadores

lisossomais para a ligação extracelular. A ausência de domínios catalíticos leva a crer que ele não ativa as vias convencionais de transdução de sinalização. Em vez disso, esse receptor internaliza e degrada o respectivo ligante e também funciona no transporte de enzimas lisossomais, regulação da apoptose e crescimento e supressão tumoral (LUDWIG *et al.*, 1996). Além disso, o *IGF2R* desempenha um papel essencial na regulação do crescimento fetal, como mostrado por camundongos mutantes. A perda desse receptor específico resulta em supercrescimento e morte neonatal. Do mesmo modo, os fenótipos de crescimento excessivo fetal em ovinos estão associados à redução da expressão de *IGF2R* (YOUNG *et al.*, 2001).

O transporte e função dos ligantes *IGF* são modulados através da interação com no mínimo seis proteínas (*IGFBPs* de 1 a 6), que podem promover ou inibir as ações do *IGF*, dependendo de cada um deles e/ou seu estado de fosforização (JONES *et al.*, 1991). As proteínas de ligação possuem maior afinidade para os ligantes *IGFs* do que seus próprios receptores (JONES & CLEMMONS, 1995). Além disso, as *IGFBPs* podem modular a acessibilidade biológica, meia-vida e atividade dos ligantes do *IGF*. As proteínas de ligação fazem isso através do transporte dos *IGFs* da circulação para os tecidos periféricos, sequestrando o excedente de *IGFs* da circulação e inibindo ou contribuindo para a atividade (JONES & CLEMMONS, 1995). Mais de 99% dos *IGFs* circulantes estão limitados à ligação das *IGFBPs*, e pelo menos 75% dos ligantes são carregados em complexos envolvendo a subunidade ácido-lábil (ALS)\IGF\IGFBP-3. Acredita-se que as ALS aumentem a meia-vida dos complexos *IGF\IGFBP-3* e o *knockdown* tem mostrado menor circulação (quase 70% do normal) da concentração de *IGF1*, resultando em crescimento pós-natal reduzido (BOISCLAIR *et al.*, 2000; FORBES & WESTWOOD, 2008). A *IGFBP-3* é a proteína de ligação predominante no soro e responsável por ligar-se e carregar a maioria dos ligantes na circulação. As *IGFBPs* de 2-4 possuem similar afinidade ao *IGF1* e *IGF2*, mas em contraste, as *IGFBPs* 1 e 6 ligam-se ao *IGF2* com uma afinidade de 10 a 100 vezes maior, respectivamente. As proteases dos *IGFBPs* são também importantes componentes da regulação da família *IGF*, pois são capazes de clivar as proteínas de ligação e alterarem sua capacidade de ligação e *status* de fosforilação, visto que a consequência da interação entre os *IGFs* e as *IGFBPs* depende desse *status* de fosforilação da molécula (DUPONT *et al.*, 2003).

2.3.2.2. Efeito no desenvolvimento embrionário e PIV de embriões

A presença de transcritos para *IGF1R*, *IGF2* e *IGF2R* já foi determinada em todas as estruturas bovinas durante a pré-implantação, desde oócitos imaturos (SATRAPA *et al.*, 2013) até o estágio de blastocisto eclodido (SAWAI, 2009), indicando que os transcritos maternos estão presentes no oócito e persistem aos estádios de clivagem antes da ativação genômica maior. Além disso, a concentração de RNAm destes genes e receptores parece seguir um padrão similar de muitos genes expressos durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário. Contudo, quando quantificados os RNAm para os membros do sistema *IGF* nos complexos *cumulus*-oócito (CCOs) entre raças taurinas e zebuínas, sugere-se uma menor biodisponibilidade de IGF livre em vacas holandesas quando comparadas a Gir (LOPES *et al.*, 2017). Após a fecundação, concentrações de *IGF* diminuem gradualmente até a ativação genômica inicial. Após a transição genômica materna-embrionária, concentrações de RNAm para *IGF2*, *IGF2R* e *IGF1R* aumentam até o estágio de blastocisto eclodido. O *IGF1R*, mais especificamente, tem sido relatado estar ativo no genoma de embriões nos estádios de 16-células e blastocisto (GRAF *et al.*, 2014). O maior aumento observado da quantidade de RNAm da família do *IGF* é observado em embriões bovinos que alcançam a fase de eclodidos, podendo indicar um importante nível desses fatores de crescimento no alongamento, quando os embriões começam tomar forma filamentosa (YASEEN *et al.*, 2001). A respeito do *IGF1*, sua presença em embriões ainda é questionada, pois enquanto alguns autores, de trabalhos mais anteriores, detectaram o ligante em embriões em estádios de pré-implantação (SCHULTZ, 1992; YOSHIDA *et al.*, 1998), outros não conseguiram encontrar níveis detectáveis de expressão do *IGF1* (BERTOLINI *et al.*, 2002a; MOORE *et al.*, 2007; YASEEN *et al.*, 2001). A localização de transcritos de *IGF2* pode ser detectada em embriões de camundongos já a partir do estágio de 2-células, e uma transição de expressão bialélica para monoalélica pode ser vista ao longo do desenvolvimento ao estágio de blastocisto, evidenciando um silenciamento progressivo do alelo materno (OHNO; AOKI; SASAKI, 2001).

Em relação ao efeito dos *IGFs* no desenvolvimento embrionário, os ligantes possuem papéis em várias respostas metabólicas, como crescimento, proliferação, sobrevivência, absorção de nutrientes, migração e diferenciação, especialmente o *IGF2* (BAKER *et al.*, 1993; CONSTANCIA *et al.*, 2002; DECHIARA; ROBERTSON; EFSTRATIADIS, 1991; GARDNER; LANE; WATSON, 2004; PAVELIC; MATIJEVIC;

KNEZEVIC, 2007). Estudos induzindo o aumento ou diminuição do *IGF2* mostraram respostas interessantes. O enriquecimento com *IGF2* no meio de maturação melhorou o número de embriões que atingiram o estágio de blastocisto e aumentaram o número de células por blastocisto (KEMPISTY *et al.*, 2015; WANG; SUN, 2007). Já por outro lado, a depleção de *IGF2* por antisense reduziu a taxa de blastocistos e o número de células totais no embrião (RAPPOLLE *et al.*, 1992). Além disso, não apenas a quantidade de *IGFs* pode sofrer de diferentes parâmetros de produção e cultivo embrionário, mas também a expressão dos genes *imprinting* em geral (WOOD; OAKEY, 2006).

Durante o desenvolvimento, a expressão gênica do sistema *IGF* também aparece alterada em prenhezes por PIV de embriões, as quais são caracterizadas por mortes embrionárias, retardo de crescimento inicial e desordens de gestação, como sintomas da AOS. Estudos têm comparado clones por TNCS, embriões por FIV e embriões *in vivo* em relação a expressão da família *IGF*, com maior abundância de RNAm para *IGF1* detectada em conceptos clones de TNCS e de FIV comparados aos *in vivo*, enquanto um maior montante detectado de RNAm para *IGF2* em embriões bovinos clones de TNCS e para *IGF2R* nas respectivas placentas (MOORE *et al.*, 2007) Em ovinos também foram relatados distúrbios de subexpressão do *IGF2R* causando supercrescimento fetal e AOS (YOUNG *et al.*, 2001). Estes estudos são consistentes com a hipótese de muitos outros, na qual os distúrbios do procedimento de clonagem por TN são associados a eventos epigenéticos para a reprogramação do núcleo da célula somática doadora dentro do citoplasto e/ou a condições de cultivo *in vitro* que alteram a expressão gênica em geral, podendo contribuir para as altas taxas de perdas embrionárias durante o início da placentação. Portanto, desordens na expressão de genes *imprinting*, especialmente o ligante *IGF2* e seu receptor *IGF2R*, podem levar a anormalidades significativas de desenvolvimento embrionário, fetal e placentário (BERTOLINI *et al.*, 2002a; CHAO; D'AMORE, 2008; SUTTEEVUN-PHERMTHAI *et al.*, 2009; WOOD; OAKEY, 2006)

Muitos estudos com mutações gênicas em camundongos foram realizados na década de 1990, principalmente, para o melhor entendimento dos efeitos biológicos dos *IGFs* e as consequências de suas interações com os receptores. Em relação aos estudos que relataram o dimorfismo em camundongos *knockdown* com vários níveis de severidade, seis tipos possíveis de fenótipos podem ser observados de peso ao nascimento: 140%, 100%, 90%, 60%, 45% e 30%. Animais que alcançaram 140% do peso corporal foram descritos em um

dos primeiros estudos relacionados à ação do *IGF2R*, onde os resultados mostraram que o *IGF2R* é um *imprinting* materno, revelando que o receptor é crucial para regular o crescimento fetal normal, pois seu *knockdown* gerou animais com 30 a 40% do peso corporal esperado, ao nascimento, mas compatível com a vida (LAU *et al.*, 1994). Os animais com apenas 30% de peso corporal foram caracterizados pela ausência de ambas as ações de *IGF1* e *IGF2*, por mutação de ambos os ligantes ou seus receptores, observados nos seguintes mutantes: *IGF2/IGF1R*, *IGF1/IGF2*, *IGF1R/IGF2R/IGF2*, *IGF1R/IR* e *IGF1R/IGF2R/IR* (BAKER *et al.*, 1993; LUDWIG *et al.*, 1996). Aqueles com 45% de crescimento corporal foram característicos da ausência de *IGF1R*, responsável por toda a ação do *IGF1* e parte do *IGF2*; nesse caso, o nanismo não é tão severo quanto os mutantes anteriores, graças à interação com o receptor de insulina responsável por parte das ações do *IGF2*. Diferentemente, a deficiência de um dos ligantes, *IGF1* ou *IGF2*, resultou em camundongos com 60% de peso corporal devido a uma sobreposição entre funções e compensação parcial pelo restante do ligante (BAKER *et al.*, 1993; DECHIARA; ROBERTSON; EFSTRATIADIS, 1991). Por fim, animais sem ação do IR tinham 90% do tamanho normal, característico daqueles com perda parcial da ação do *IGF2*. Entretanto, em alguns tecidos como a placenta, a função de promoção do crescimento ocorria apenas pela interação *IGF2* e *IR*, com essa interação bloqueando de certa forma o atraso no desenvolvimento, mesmo que menos pronunciado pela resposta compensatória do *IGF1* (LOUVI; ACCILI; EFSTRATIADIS, 1997).

2.4. Manipulação epigenômica: vetores de expressão episomal

Uma forma utilizada para manipulação epigenômica é através do uso de vetores para expressão gênica, uma vez que os transgênicos não são adequados para analisar a função de muitos genes. Por exemplo, genes com funções importantes em animais adultos podem ser letais quando eliminados na fase embrionária, caso também tenham funções importantes no desenvolvimento inicial (LUNDSTROM, 2015). Além disto, inserções de DNA podem ter efeitos de longo alcance, tais como mutações de inserção ou silenciamento por metilação de um novo gene. Dessa forma, vários sistemas usando vetores de expressão gênica são atualmente usados para modificações genéticas de animais sem a integração do gene em questão no genoma do animal de forma definitiva, podendo controlar espacial e temporalmente a expressão pretendida (RAMAMOORTH; NARVEKAR, 2015).

Os primeiros vetores foram construídos baseados em sistemas genéticos virais, os adenovírus, e a partir daí foram existindo diferenças de expressão de acordo com a característica de cada vetor. Por exemplo, há um tipo capaz de amplificar o seu genoma depois de entrarem na célula-alvo; outros que resultam em perda de moléculas durante as divisões celulares com um curto tempo de expressão do gene em questão (transientes); outros são capazes de integrar seu genoma na célula hospedeira a fim de utilizar a maquinaria celular para sua própria amplificação, e a última categoria são os sistema de vetores capazes de replicar o DNA autossomicamente, como elementos extra-cromossomais (vetores episomais). Apesar destes vetores serem eficazes, há problemas de segurança no uso dos vetores derivados de sistemas virais, reações inflamatórias ao vetores virais, inserção de mutantes transformando essas células em malignas, entre outros (CAVAZZANA-CALVO *et al.*, 2000; RAMAMOORTHY; NARVEKAR, 2015). A partir disso, desenvolveram-se vetores episomais não virais baseados em plasmídeos bacterianos. Tais plasmídeos têm vantagens de serem de baixa toxicidade e imunogenicidade, não possuem recombinação endógena de vírus, e serem de baixo risco de mutações de inserção, baixo custo de produção e boa reprodutibilidade. Estes vetores são basicamente plasmídeos de DNA que podem ser distribuídos às células-alvo como DNA puro ou em associação com diferentes compostos, tais como nano-esferas de lipossomos ou poliamida (BELIZARIO *et al.*, 2012).

Os vetores de clonagem do DNA-alvo mais comumente utilizados são plasmídeos de *Escherichia coli*, com pequenas moléculas de DNA circular que incluem três regiões funcionais: (1) uma origem de replicação, (2) um gene de resistência a antibióticos, e (3) uma região onde o DNA de interesse pode ser inserido sem interferir com a replicação do plasmídeo ou expressão do gene de resistência ao fármaco (KAUFMAN *et al.*, 2000). Duas enzimas são utilizadas para produzir plasmídeos recombinantes, que são as enzimas de restrição que cortam o DNA em sequências específicas de 4 a 8 pb, deixando muitas vezes caudas auto-complementares de cadeia simples (extremidades coesivas). Tais enzimas são utilizadas para cortar moléculas de DNA longas em múltiplos fragmentos de restrição e para cortar um vetor plasmideal em um único local. Se um fragmento de restrição e um vetor plasmideal cortado com extremidades complementares forem misturados sob condições adequadas, e com a presença de DNA ligase, formar-se-ão ligações entre o fragmento de restrição e o DNA do vetor. Quando os plasmídeos recombinantes são

incubados em *E. coli*, uma fração muito pequena das células toma um único plasmídeo recombinante. Estas células transformadas, que possuem o gene de resistência ao fármaco plasmídico, podem ser selecionadas por plaqueamento em ágar nutriente contendo o antibiótico. Todas as células em cada colônia que crescem neste meio contêm plasmídeos idênticos descendentes do único plasmídeo que entrou na célula fundadora da colônia. Colônias isoladas representam, assim, milhares de clones dos fragmentos de restrição originalmente inseridos no vetor plasmideal (FREEMAN *et al.*, 2000).

Já foi demonstrado em muitos estudos que um vetor circular com expressão episomal (fora do genoma celular) se mantém estável em células de mamíferos *in vitro*, as quais replicam-se de forma autônoma em várias linhagens celulares e células primárias, inclusive quando microinjetados na fase de pronúcleo de oócitos de camundongos fecundados ou após injeção intracitoplasmática em zigotos bovinos (IQBAL *et al.*, 2009). A eficiência de expressão depois de uma transfecção transiente de DNA plasmideal é dependente do número de células que incorporou este DNA, o número de cópias do gene e o nível de expressão por gene (KAUFMAN *et al.*, 2000). Para muitas linhagens celulares estabilizadas, é possível a introdução diretamente do DNA plasmideal em 5-50% das células de uma população-alvo, dependendo do método utilizado (KEOWN *et al.*, 1990). A utilização de vetores plasmideais de expressão episomal em células, gametas e embriões representa uma ferramenta de interesse para a possibilidade de expressão transiente de genes específicos, com a possibilidade da avaliação dos efeitos celulares biológicos nas células ou estruturas tratadas, para estudo temporal da função gênica em diversos organismos, como o estudo do efeito da sobre-expressão de genes pleiotrópicos, como o *IGF2*, no desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, sujeito de pesquisa desta dissertação.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1. Hipóteses

H₁: A expressão do gene *IGF2* bovino de forma episomal transiente em embriões bovinos derivados de FIV em estádios de pré-implantação causará um efeito pleitrópico sobre o desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto, com aumento na cinética de desenvolvimento, sem comprometimento na qualidade morfológica ou taxa de desenvolvimento *in vitro* quando comparados aos controles.

H₂: A microinjeção intracitoplasmática em embriões no estágio de 1-célula não comprometerá o desenvolvimento embrionário *in vitro* em relação ao controle.

H₃: A microinjeção intracitoplasmática em embriões no estágio de 1-célula será eficiente para a biodisponibilidade do vetor com o gene *IGF2* acompanhado da proteína fluorescente verde (GFP), com a obtenção de mais de 50% de blastocistos fluorescentes.

3.2. Objetivos gerais

a) Desenvolver estudos em biologia do desenvolvimento relacionados à expressão episomal do gene *IGF2* por meio de microinjeção intracitoplasmática em embriões bovinos no estágio de 1-célula produzidos *in vitro* visando o aumento da eficiência nos índices de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* relativos ao uso de embriões produzidos *in vitro*.

3.3. Objetivos específicos

a) Determinar um protocolo de microinjeção intracitoplasmática de ácidos nucleicos em embriões bovinos produzidos *in vitro* por FIV, no estágio de 1-célula, sem o comprometimento da viabilidade embrionária *in vitro*.

b) Determinar a dose-resposta da microinjeção intracitoplasmática do vetor de expressão com o gene *IGF2* bovino sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* e morfologia embrionária em blastocistos bovinos de FIV.

- c) Determinar a expressão epissomal do gene *IGF2* associado à proteína GFP pela taxa de fluorescência dos blastocistos e relacionar à cinética de desenvolvimento embrionário e qualidade morfológica dos embriões no Dia 7 de desenvolvimento *in vitro*.

4. CAPÍTULO ÚNICO: *In vitro* development of IVF-derived bovine embryos following cytoplasmic microinjection for the episomal expression of the *IGF2* gene

Karine Campagnolo, Felipe Ongarato, Bruna Rodrigues Willhelm, Camila Rodrigues de Freitas, Camilo Andrés Peña Belo, Karine de Mattos, Gabriella de Oliveira Borba, Elvis Ticiani, José Luiz Rigo Rodrigues, Marcelo Bertolini

Trabalho formatado a ser submetido para publicação para o periódico *Zygote*.

1 ***In vitro* development of IVF-derived bovine embryos following cytoplasmic**
2 **microinjection for the episomal expression of the *IGF2* gene**

3
4
5 Karine Campagnolo, Felipe Ongarato, Bruna Rodrigues Willhelm, Camila Rodrigues de
6 Freitas, Camilo Andrés Peña Belo, Karine de Mattos, Gabriella de Oliveira Borba, Elvis Ticiani,
7 José Luiz Rigo Rodrigues, Marcelo Bertolini^a

8
9
10 ¹School of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto
11 Alegre, RS, Brazil

12
13
14
15
16 ^aCorresponding author: Marcelo Bertolini (M. Bertolini)

17 Postal address: Embryology and Biotechnology of Reproduction Lab, School of Veterinary
18 Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9090 -
19 Porto Alegre, RS - Brazil - 91.540-000

20 E-mail addresses: marcelo.bertolini@ufrgs.br, mbertolini@ymail.com

21

22 **Introduction**

23 Embryonic losses due to failures in the establishment of pregnancies with *in vitro*-
24 produced (IVP) bovine embryos ultimately lead to lower reproductive efficiency compared to
25 other reproductive technologies used for cattle breeding (Diskin *et al.*, 2016, Gerger *et al.*, 2017).
26 Pieces of evidence suggest that the higher mortality observed in IVP embryos may be a
27 consequence of a delay in the initial embryo growth and an asynchrony in maternal-embryonic
28 connections and exchanges, leading to embryonic and fetal malnutrition, initial growth
29 retardation and increased mortality during the first trimester of pregnancy (Bertolini *et al.*, 2002,
30 Chavatte-Palmer *et al.*, 2006). Among factors related to embryonic losses, studies show that
31 epigenetic changes affect the pattern of gene regulation by genomic *imprinting*, in which only
32 one specific parental allele has an active expression, while the other is silenced by typical
33 epigenetic processes (Keverne 2015, Heinzmann *et al.*, 2011). In fact, it has been demonstrated
34 that IVP bovine embryos demonstrate changes in the expression pattern of *imprinting* genes
35 related to the IGF system, more specifically, the IGF2 ligand and its IGF2R receptor (Moore *et*
36 *al.*, 2007, Suteevun -Phermthai *et al.*, 2009), which are expressed by the paternal and maternal
37 alleles, respectively. Notably, both genes are directly related to the control of conceptus growth
38 and embryonic, fetal and placental development throughout pregnancy in mammals (Liu *et al.*,
39 2008, Han *et al.*, 2013, Mikaelsson *et al.*, 2013).

40 Gene-modulated studies using episomal expression vectors are commonly used to
41 evaluate physiological consequences of the expression of specific proteins in mammalian cells
42 aiming at understanding biological regulatory or control mechanisms (Kaufman *et al.*, 2000). For
43 this, the microinjection is an essential approach in the study of mammalian oocytes and early
44 embryos and is useful for the introduction of many molecules and reagents, as in our case, of
45 episomal expression vectors (Blogliotti *et al.*, 2016). As already demonstrated by other authors,

46 the IGF2 ligand and its IGF2R receptor are expressed in cattle from immature oocytes to hatched
47 blastocysts (Han *et al.*, 2003, Perecin *et al.*, 2009, Lopes *et al.*, 2017, Willhelm *et al.*, 2018), and
48 the permanent loss of *imprinting* of both the IGF2 and the IGF2R genes in mice results in fetal
49 overgrowth (IGF2) or prenatal lethality (IGF2R; Baker *et al.*, 1993; Lau *et al.*, 1994; Ludwig *et*
50 *al.*, 1996, Constância *et al.*, 2002). Similarly, the constitutive IGF2 overexpression in transgenic
51 mice leads to conceptus overgrowth (DeChiara *et al.*, 1990). Thus, considering that IVP bovine
52 embryos are associated with an early pattern of delay in development (Bertolini *et al.*, 2002), it is
53 possible that transient *IGF2* gene overexpression at early preimplantation stages may stimulate
54 early embryo growth, as such ligand promotes cell proliferation and differentiation and had
55 already been related to major changes in development observed in bovine concepti derived from
56 *in vitro* embryo production procedures, such as *in vitro* fertilization (IVF) or cloning by nuclear
57 transfer (NT; Rappolee *et al.*, 1992, Constância *et al.*, 2002). Then, this study aimed to transiently
58 induce the overexpression of the bovine *IGF2* gene in early preimplantation stage embryos to
59 evaluate its effects on embryo growth and development up to the blastocyst stage in cattle.

60 **Materials and methods**

61 Chemicals and reagents were from Sigma Chemical Company (Sigma-Aldrich, St. Louis,
62 MO, USA), unless stated otherwise.

63 *In vitro* production of bovine embryos

64 Nine independent replicates for the *in vitro* production of bovine embryos were performed
65 by *in vitro* fertilization, following our established procedures (Gerger *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*,
66 2009).

67 *In vitro* maturation (IVM)

68 Bovine ovaries were obtained from a regional slaughterhouse and transported to the
69 laboratory in saline solution (0.9% NaCl; 30°C) and *cumulus*-oocyte complexes (COCs) were

70 aspirated from 2- to 8-mm follicles using a 10-mL syringe coupled to a 18G needle. Grade 1 and
71 2 COCs were recovered and selected under a stereomicroscope, and randomly distributed into
72 microdroplets under mineral oil for IVM at 38.5°C, 5% CO₂ and 95% humidity for 22 to 24 h in
73 IVM medium composed of TCM-199 with Earle's salts, L-glutamine and HEPES, 0.2 mM
74 sodium pyruvate, 26.1 mM sodium bicarbonate, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS),
75 supplemented with 5 IU/mL FSH-p (Folltropin, Bioniche, USA), 10 IU/mL hCG (Chorulon,
76 Intervet, Inc., USA), and 1 mg/mL 17-β estradiol. A solution containing 10⁵ IU/mL sodium
77 penicillin, 10 mg/mL streptomycin sulfate, and 25 mg/mL amphotericin B (GIBCO-BRL, Life
78 Technologies, Grand Island, NY, USA) was added to the medium (1:100).

79 *In vitro fertilization*

80 Procedures for *in vitro* sperm capacitation and IVF were based on Parrish *et al.* (1986),
81 modified by Ribeiro *et al.* (2009) and Gerger *et al.* (2017). Frozen–thawed bovine sperm cells
82 from doses of the same bull were segregated by Percoll[®] gradient with Sperm-TALP medium.
83 Following IVM, groups of 15 to 20 COCs were co-cultured with capacitated sperm cells, in
84 microdroplets of IVF-TALP medium, under mineral oil, at an insemination dose of 7.000 viable
85 sperm cells/COC, at 38.5°C, 5% CO₂ and saturated humidity for 18 h. Then, presumptive zygotes
86 were denuded by vortexing with 0.01% hyaluronidase in HEPES-buffered M-199 and 10% FBS.

87 *Overexpression of IGF2 gene*

88 A circular plasmid constructed and packaged by VectorBuilder (Shenandoah, TX, USA),
89 was used to drive the episomal *IGF2* expression into preimplantation bovine embryos following
90 intracytoplasmic microinjection. The IGF2-GFP vector (id: VB170913-1051uhx) contained the
91 active *IGF2* gene sequence, comprehending exons 8, 9 and 10, and the green fluorescent protein
92 (GFP) reporter gene. The *IGF2* gene sequence was under the control of the human
93 cytomegalovirus (CMV) promoter with the Kozak sequence in between, which aimed to facilitate

94 the translation initiation of the ATG start codon downstream the Kozak sequence. Following the
95 *IGF2* sequence, the vector had a PolyA signal (SV40), that allows transcription termination and
96 polyadenylation of mRNA transcribed by PolIII RNA polymerase. In addition, the circular vector
97 had the ampicillin resistance gene, in a total of 5,087 bp. The vector design for gene expression in
98 mammalian cells was based on Kaufman *et al.* (2000).

99 *Experimental groups and intracytoplasmic microinjection*

100 After denuding, zygotes were randomly segregated into six groups: (a) non-microinjected
101 control group, (b) microinjected control group, with the microinjection of only buffer medium
102 (TE solution, Tris-EDTA, or 0 ng/ μ L), and four groups of embryos microinjected with the IGF2-
103 GFP circular expression vector in TE solution, varying the concentration from (c) 10 ng/ μ L, (d)
104 20 ng/ μ L, (e) 40 ng/ μ L, to (e) 80 ng/ μ L. Structures to be microinjected were allocated in drops
105 with HEPES-buffered M-199 and 10% FBS supplemented with 5 μ g/mL cytochalasin B, under
106 mineral oil. Microinjection was performed using a microinjector apparatus (Femtojet 4i,
107 Eppendorf, Germany) coupled a micromanipulator. The injected volume into each zygote was 15
108 pL (1.5% of the total volume of the zygote) and the tips were produced in the laboratory where
109 there was one for each group by replicate.

110 *Embryo in vitro culture*

111 After intracytoplasmic injection, structures from all microinjected groups and the
112 noninjected control group were *in vitro*-cultured (IVC) into four-well dishes containing 450 mL
113 modified SOF culture medium (Holm *et al.*, 1999), supplemented with 1.5 mM D-glucose and
114 5% FBS, cultured in the foil bag system, at 39°C, saturated humidity and 5% CO₂, 5% O₂ and
115 90% N₂ up to the blastocyst stage on Day 7 of development. Embryo survival rate was assessed
116 24 h after microinjection (48 hpf), with the removal of lysed structures from each well. Cleavage

117 and blastocyst rates were determined on Days 2 (48 hpf) and 7 (168 hpf) of development
118 (IVF=Day 0).

119 *Assessment of embryo quality and stage, kinetics of development, and fluorescence expression on*
120 *Day 7 of development*

121 Assessment of embryo morphological quality (grades 1, 2 and 3) and stage of
122 development (early blastocyst (5), blastocyst (6) end expanded blastocyst (7) on Day 7 of
123 development was based on procedures adapted from the *International Embryo Transfer Society*
124 manual for *in vivo*-derived embryos (Stringfellow and Givens, 2010). Qualitative (negative or
125 positive expression) and semi-quantitative (expression level based on intensity) assessment of
126 GFP expression (green fluorescence) in Day-7 blastocysts microinjected with 10, 20, 40 or 80
127 ng/ μ L vector at the 1-cell stage was analyzed under UV light in an epifluorescent microscope,
128 and were recorded as grade 0 (no fluorescence), and 1, 2 and 3, for low, medium and high
129 fluorescence intensity level.

130 Groups of Day-7 blastocysts from all experimental groups were used for the estimation of
131 the total embryo cell number, based on Ribeiro *et al.* (2009). In brief, embryos (stages 5, 6 and 7)
132 were fixed randomly in ice-cold absolute ethanol, to be exposed to 10 mg/mL *bis*benzimidazole
133 (Hoechst 33342) in absolute ethanol for 7 min. Then, embryos were transferred to a drop of
134 glycerol on a glass slide, covered with a cover slip, and then exposed to UV light in an
135 epifluorescent microscope for cell counting. Cell counts were performed by two operators and,
136 when differences exceeded 10%, a third operator reanalyzed the sample, with the disposal of the
137 most divergent count.

138 *Data analyses*

139 Qualitative data regarding survival, cleavage, and blastocyst rates, GFP expression and
140 embryo quality and developmental kinetics were compared by the Chi-square or Fisher's Exact

141 tests. Quantitative data regarding total number of cells on Day 7 were analyzed by analysis of
142 variance (ANOVA) followed by the LSMeans Student t-test using the JMP software (SAS
143 Institute Inc., Cary, NC, USA). Data were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk
144 test. Results are presented as means \pm standard error of the mean (SEM), for $p < 0.05$.

145 **Results**

146 *In vitro production of bovine embryos*

147 A total of 771 slaughterhouse-derived bovine ovaries were used in this study, weighing
148 approximately 6.4 kg. A total of 6,101 COCs were retrieved, leading to a mean of 8.30
149 structures/ovary, from which, 1,752 (28.7%) were selected for IVM and IVF. After 24 h of
150 intracytoplasmic microinjection, no differences in survival rates were observed between groups
151 of microinjected embryos (Table 1), with the overall mean survival rate of 87.4% (919/1052).
152 Likewise, no differences in cleavage rates were detected between groups (Table 1), based on the
153 total number of embryos placed in cultured in the nonmicroinjected control group, or the total
154 number of embryos in IVC that survived microinjection on Day 1 of development. Blastocyst
155 rates on Day 7 of development, when based on total number of embryos in IVC per group, were
156 similar between nonmicroinjected controls, and embryos microinjected with 0, 20, and 40 ng/ μ L,
157 with development to the blastocyst stage being lower in the 10 and 80 ng/ μ L microinjected
158 groups, in comparison the nonmicroinjected groups (Table 1), with the former being also
159 different than the 0 and 40 ng/ μ L groups, whereas the latter was similar to all microinjected
160 groups. When based on cleaved embryos per group, a similar pattern was observed, denoting, in
161 both circumstances, that blastocyst rates did not follow any dose-response pattern, with the
162 microinjection of the lowest and highest doses tested in this study being associated with the
163 lowest rates of development to the blastocyst stage.

164 *Embryo kinetics and embryo evaluation*

165 Embryo kinetics at 48 hpf (Day 2) revealed that 48.2% (141/292), 45.8% (66/144), and
166 41.0% (77/187) of all cleaved zygotes in the Control nonmicroinjected IVP group, and in the 10
167 and 40 ng/ μ L microinjected groups progressed to the 4- to 8-cells embryo stages, being similar
168 between groups. However, development to the 4- to 8-cell stage embryos was lower in the 0
169 (39.4%, 91/231), 20 (33.0%, 59/179), and 80 (38.2%, 68/178) ng/ μ L microinjected groups than
170 nonmicroinjected controls and the 10 ng/ μ L, being similar to the 40 ng/ μ L microinjected group.
171 If embryo kinetics at 48 hpf is based only on development to the 8-cell stage, on a per total
172 embryos in IVC per group, the 20 ng/ μ L microinjected group had fewer more developed embryos
173 (11.7%, 21/179) than nonmicroinjected controls (20.5%, 60/292) and the 10 ng/ μ L (20.1%,
174 29/144), with the 0 (16.0%, 37/231), 40 (16.0%, 30/187), and 80 (15.7%, 28/178) ng/ μ L
175 microinjected groups being similar to one another and with nonmicroinjected controls, and the 10
176 and 20 ng/ μ L groups (Figure 1). Embryo kinetics up to the 8-cell stage embryo, on a per cleaved
177 embryos per group, followed the same pattern as for the total embryos in IVC per group.

178 The evaluation of embryo kinetics at 168 hpf (Day 7) showed an increase in development
179 in the 10 ng/ μ L group, with significantly more embryos at more advanced stages of development
180 (blastocysts and expanded blastocysts, 93%, 14/15) than the 0 (60%, 23/38), 20 (69%, 24/35), 40
181 (60%, 18/30), and 80 (55%, 12/22) ng/ μ L microinjected groups, but not different than the
182 nonmicroinjected controls (69%, 47/68) (Figure 2). The 10 and 40 ng/ μ L groups expressed
183 differences on embryo morphology with higher rates of grade 1 (67.0%, 10/15, and 70.0%, 21/30,
184 respectively) than nonmicroinjected controls (54.0%, 37/68), and the 0 (50.0%, 19/38), 20
185 (40.0%, 14/35) and 80 (45.0%, 10/22) ng/ μ L microinjected groups (Figure 3).

186 On Day 7 of development, between 49 and 67% of the blastocysts in the groups
187 microinjected with various vector doses (10 to 80 ng/ μ L) positively fluoresced under UV light
188 (GFP+), with no differences between groups (Table 1). No GFP fluorescence was detected in the

189 control groups (nonmicroinjected or the 0 ng/ μ L microinjected groups), as expected. For GFP+
190 blastocysts, the fluorescence levels or intensity (low, medium, high), on a per embryo basis, did
191 not significantly differ between groups. (Figure 4). However, most embryos had a lower level of
192 fluorescence intensity in each group (65 to 80%) than medium or higher levels (Figure 4),
193 irrespective of the vector dose. Interestingly, the total number of cells in blastocysts in the 10
194 ng/ μ L group (116.0 ± 3.0) was 35.3 and 29.3% higher than the nonmicroinjected control
195 (75.0 ± 6.8) and 0 ng/ μ L control microinjected (82.0 ± 6.0) groups, respectively, being also higher
196 than the other microinjected counterpart groups (Figure 5).

197 Data for the probability outcomes and relative efficiency by experimental group for
198 embryo development on Day 7 to more advanced stages of development (blastocyst, stage 6, or
199 expanded blastocyst, stage 7), better morphological quality (grade 1) and with positive GFP
200 fluorescence, from the total number of COCs used for IVF in each group, are presented in Table
201 2. Microinjected groups with 20, 40, and 80 ng/ μ L vector doses had lower relative efficiency than
202 nonmicroinjected controls, requiring more COCs to result in better and more advanced GFP-
203 positive blastocysts on Day 7. However, the 0 and 10 ng/ μ L groups were similar to
204 nonmicroinjected controls and to the other microinjected groups. If we consider the mean
205 survival rate for the microinjected groups (87.4%) and the mean positive fluorescence rates for
206 the embryos microinjected with the expression vector (58.0%) as estimates for the control
207 groups, the relative efficiencies and ratios for the nonmicroinjected group and for the buffer-only
208 microinjected group (0 ng/ μ L) would be, respectively 0.044 (1:23) and 0.025 (1:40), which are
209 similar to the groups microinjected with the IGF2 expression vector. Therefore, the
210 microinjection with the expression vector did not affected development, either positively or
211 negatively, under the conditions of this study, except for the 10 ng/ μ L group, which had

212 parameters of development that appeared to result in fewer blastocysts, but with higher
213 developmental potential than controls.

214 **Discussion**

215 The overall efficiency of a conventional IVP system remains very low when compared to
216 *in vivo* embryo development. Studies carried out with different mammalian species, in special
217 cattle, have shown that *in vitro*-produced embryos differ in many aspects, including gene
218 expression, morphology and ultrastructure, metabolic activity, and kinetics of development
219 (Bertolini *et al.*, 2002, Chavette-Palmer *et al.*, 2012, Dobbs *et al.*, 2013, Gerger *et al.*, 2017).
220 There are also recent pieces of evidence suggesting that the IGF family and corresponding
221 downstream signaling factors are involved in the conceptus and postnatal development in
222 mammals, and epigenetic dysregulation in both maternal (e.g., IGF2R) and paternal (e.g., IGF2)
223 imprinting genes may lead to an exacerbation of conceptus abnormalities for IVP embryos, which
224 is even more pronounced after cloning by SCNT (Roberts *et al.*, 2008, Wei *et al.*, 2010, Strapa *et*
225 *al.*, 2013, O'Doherty *et al.*, 2015, Mackin *et al.*, 2018). Differences in relative transcription have
226 already been seen between IVP concepti and *in vivo*-produced, with lower IGF2 expression in
227 Day-7 IVP embryos and higher IGF2R expression in *in vivo* embryos, with evidence of delayed
228 physical development in IVP concepti (Bertolini *et al.*, 2002). Therefore, we hypothesized that an
229 increased expression of the IGF2 gene transiently in early embryonic development could have a
230 growth-promoting effect on embryo development up to the blastocyst stage, resulting in no
231 compromise, and perhaps in positive effect, on embryo kinetics, morphological quality or
232 development when compared to controls. Results from this study partially corroborate with that
233 hypothesis.

234 In this study, intracytoplasmic microinjection procedures were effectively used to deliver
235 a circular expression vector into 1-cell stage zygotes, which is an essential method to introduce

236 foreign materials into biological cells (Bogliotti *et al.*, 2016). Findings from this study
237 demonstrated that a mean of of 58% of the embryos visually expressed the GFP reporter gene
238 under UV light at the blastocyst stage on Day 7 (Table 1), with a rather low level of fluorescence
239 (Figure 4). It is known that the introduction and expression of circular plasmid varies in the range
240 of 5 to 50% in the cells of a target population, but little pieces of information exist for the
241 cytoplasmic microinjection into zygotes (Kaufman 2000, Gao *et al.*, 2007). Our previous studies
242 involving cationic lipid-based transfection of zona-free bovine 1-cell stage IVP embryos with a
243 similar GFP expression vector demonstrated that approximately 50% of the embryos expressed
244 the reporter gene in Day-7 blastocysts (Bertolini *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2012). It is speculated
245 that for the sort of studies above, at least a proportion of embryos that do not fluoresce may not
246 reach the threshold for visual detection under UV light, which could be confirmed by molecular
247 analysis for the detection of transcripts for the vector's genes, a procedure that was not performed
248 in this study. Although no statistical differences were detected between groups, the dose of 10
249 ng/ μ L had a higher proportion of fluorescent embryos (67%, 10/15), which coincides with the
250 same group in which growth-promoting effects were observed in Day-7 developed blastocysts,
251 relative to controls. Perhaps the lowest dose determines an optimal IGF2 expression pattern
252 during development, or the use of a lower dose does not induce an overexpression of the reporter
253 gene, which may be healthier to cells (Chen *et al.*, 2004, Ata-Abadi *et al.*, 2015). A dose-
254 response effect was not detected in this study regarding negative or positive effects on
255 development, as expected. However, the use of the highest dose appeared to be more detrimental
256 than beneficial to development, although not clearly evident. The observation that GFP intensity
257 seven days after microinjection was rather low and did not follow a dose-response may indicate
258 that either vector degradation/dilution into blastomeres or vector expression in developing
259 embryos may follow a biological pattern that may not be associated with the initial dose. It is also

260 possible that the increase in the vector dose may have ambiguous effects, as the vector was
261 tailored for the expression of IGF2, a growth-promoting gene, but also for the expression of a
262 useless protein (GFP). On one hand, as embryo follows the genome activation, a biological
263 response for the overexpression of the IGF2 gene may induce biological responses, which may be
264 counteracted by the GFP expression, as such functionless protein can trigger a cellular response
265 of degradation of the exogenous DNA or yet the presence of a bacterial backbone in the
266 expression plasmid may cause undesirable effects by triggering the immune responses in
267 mammals and repression of episomal transgene expression (Chen *et al.*, 2004, Ata-Abadi *et al.*,
268 2015). Nevertheless, several transgenic animals constitutively expressing GFP have already been
269 produced without evidence of detrimental physiological effects (Crispo *et al.*, 2014). More
270 studies should focus on this aspects, including the molecular analyses of embryos.

271 Timing for cell division, cell-cycle interval, and synchrony of the cell cycle are suggested
272 to be biological markers of embryo quality and viability (Herrero *et al.*, 2013), and the correlation
273 between morphokinetics and morphological embryo grade can be observed when examining
274 cavitation, the stage of development and morphology on Day 7 of *in vitro* development (Cruz *et*
275 *al.*, 2012). Thus, in order to obtain additional information about the IGF2 overexpression during
276 embryo development, the kinetics for injected embryos was evaluated in this study (Figure 2).
277 Our findings indicated that the lower microinjection dose of IGF2 gene episomal expression
278 vector improved embryo kinetics, for more advanced and better quality blastocysts on Day 7,
279 which had more total number of cells, even though blastocyst development was lower than
280 controls. In fact, he relative efficiency for the production of better quality, more developed GFP-
281 expressing blastocysts after microinjection was similar between groups, with a trend to be more
282 efficient at the lowest dose used in this study. It is known that the early-cleaved embryos have
283 higher developmental capacity and distinct metabolic patterns (Barreta *et al.*, 2012, Herrero *et al.*,

284 2013, Milazzotto *et al.*, 2016). However, cleavage and embryo kinetics (number of blastomeres
285 in developing embryos) on Day 2 of did not differ between groups. Likely, the embryo kinetic
286 differences observed on Day 7 are consequences of the vector expression after embryo genome
287 activation, between 8- and 16-cell stage embryos, once the vector needs an active transcription
288 (Kaufman *et al.*, 2000). Therefore, IGF2 may have exerted its pleiotropic effects immediately
289 prior to compaction through cavitation, with a more optimal biological response seen at lowest
290 dose.

291 Findings regarding survival, cleavage and blastocyst rates showed few variations between
292 the treated groups for IGF2 overexpression and the nonmicroinjected and 0 ng/ μ L microinjected
293 control groups. Other studies demonstrated that zygote microinjection did not affect development
294 (Crispo *et al.*, 2015). Since *knockout* mouse models for IGF2 (Baker *et al.*, 1993) showed that
295 IGF2 regulates trophoblast development and function at the fetomaternal interface, perhaps the
296 effects of the treatments may be more evident at later stages, following the transfer to surrogate
297 females. Indeed, it has been reported that greatest increase in the amount of mRNA of the IGF
298 family is observed in bovine embryos after the hatching stages up to elongation, with a potential
299 important effect in the elongation process, prior to pregnancy recognition (Yaseen *et al.*, 2001).
300 Studies to evaluate the effects of the IGF2 transient expression in preimplantation embryos on *in*
301 *vivo* development are yet to be completed.

302 In summary, this study was designed to determine the effect of the IGF2 overexpression n
303 early embryo development. Findings from this study revealed that embryos with IGF2
304 overexpression had similar development patterns than controls. The benefit of IGF2
305 overexpression on *in vitro* development of IVF bovine embryos still needs to be further
306 elucidated. Our efforts to understand these effects on development ultimately intend to increase
307 our knowledge on the process of embryology and abnormalities seen after embryo manipulations.

308 **Acknowledgements**

309 The authors thank the FrigoLeo Ltda. (São Leopoldo, RS, Brazil) for supplying bovine
310 ovaries. The authors also thank Dr. L. Relly for technical assistance in some parts of the study.

311 **Financial Support**

312 This study was supported by research grants no. 407.280/2013-8 and no. 449.509/2014-1
313 from CNPq/Brazil. K.C. was supported by a scholarship from CAPES/Brazil.

314 **Statement of Interest**

315 The authors declare that there is no conflict of interest in the research reported.

316 **References**

- 317 Baker J. *et al.* (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*,
318 v. 75, p. 73-82.
- 319 Bertolini, M. *et al.* (2002) Morphology and morphometry of *in vivo*- and *in vitro*-produced
320 bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights.
321 *Theriogenology*, v. 58, n. 5, p. 973-994.
- 322 Bertolini, M. *et al.*, (2006) Embryo survival following lipid-based transfection of 1-cell stage
323 bovine embryos with small interfering RNA (siRNA) fragments and/or DNA. *Reproduction*,
324 *Fertility and Development*, v. 18. p. 168.
- 325 Chavatte-Palmer, P. *et al.* (2006) Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated
326 glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones.
327 *Theriogenology*, v. 66, n. 4, p. 829-840.
- 328 Constancia, M. *et al.* (2002) Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal
329 growth. *Nature*, v. 417, n. 6892, p. 945-948.

- 330 DeChiara T., Efstratiadis A., Robertson E. (1990) A growth deficiency phenotype in
331 heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting.
332 Nature, v. 345, p. 78-80.
- 333 Diskin, M. G. *et al.* (2016) Pregnancy losses in cattle: Potential for improvement. Reproduction,
334 Fertility and Development, v. 28, n. 1–2, p. 83-93.
- 335 Gerger, R. P. C. *et al.* (2017) Impact of cumulative gain in expertise on the efficiency of
336 handmade cloning in cattle. Theriogenology, v. 95, p. 24-32.
- 337 Han, X. *et al.* (2013) Aberrant expression of Igf2/H19 in porcine parthenogenetic fetuses and
338 placentas. Animal Reproduction Science, v. 139, p. 101-108.
- 339 Han, D. W. *et al.* (2003) Expression of IGF2 and IGF receptor mRNA in bovine nuclear
340 transferred embryos. Zygote, v. 11, p. 245-252.
- 341 Heinzmann, J. *et al.* (2011) Epigenetic profile of developmentally important genes in bovine
342 oocytes. Molecular Reproduction and Development., v. 78, p. 188-201.
- 343 Kaufman, R. J. *et al.* (2000) Overview of vector design for mammalian gene expression.
344 Molecular Biotechnology, v. 16, p. 151-160.
- 345 Keverne, E. B. (2015) Genomic *imprinting*, action, and interaction of maternal and fetal
346 genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 112, p. 6834-6840.
- 347 Lau, M. M. *et al.* (1994) Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate
348 receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. Genes & Development, v. 8, n. 24,
349 p. 2953-2963.
- 350 Liu, J. H. *et al.* (2008) Aberrant DNA methylation *imprints* in aborted bovine clones. Molecular
351 Reproduction and Development, v. 75, n. 4, p. 598-607.

- 352 Lopes, A. C. *et al.* (2017) Differential expression of insulin-like growth factor family members in
353 immature cumulus–oocyte complexes from dairy cows with different genotypes. *Reproduction*
354 in *Domestic Animals*, v. 52, n. 6, p. 1067-1073.
- 355 Ludwig, T. *et al.* (1996) Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued
356 from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds. *Developmental Biology*, v. 177, n.
357 2, p. 517-535.
- 358 Mikaelsson, M. A. *et al.* (2013) Placental programming of anxiety in adulthood revealed by *Igf2*-
359 null models. *Nature Communications*, v. 4, p.2311.
- 360 Moore, K. *et al.* (2007) Insulin-like growth factor (IGF) family genes are aberrantly expressed in
361 bovine conceptuses produced *in vitro* or by nuclear transfer. *Theriogenology*, v. 68, n. 5, p.
362 717-727.
- 363 Perecin, F. *et al.* (2009) Imprinted gene expression in *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine
364 embryos and chorio-allantoic membranes. *Genetics and Molecular Research*, v. 8, p. 76-85.
- 365 Ribeiro, E. S. *et al.* (2009) Developmental potential of bovine hand-made clone embryos
366 reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning and Stem*
367 *Cells*, v. 11, p. 377-386.
- 368 Rappolee, D. A. *et al.* (1992) Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth
369 pathway regulated by imprinting in early mouse embryos. *Genes & Development*, v. 6, p. 939-
370 952.
- 371 Stringfellow D. A., Givens, M. D. (2010) *Manual of the International Embryo Transfer Society*
372 (IETS). 4th ed. Champaign, IL: IETS.
- 373 Suteevun-Phermthai, T. *et al.* (2009) Allelic switching of the imprinted IGF2R gene in cloned
374 bovine fetuses and calves. *Animal Reproduction Science*, v. 116, n. 1–2, p. 19-27.

- 375 Vieira F. K. *et al.* (2012) *In vitro* development and cell allocation after aggregation of syngeneic
376 wild type and fluorescence-expressing bovine cloned embryos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.
377 40, p. 1057.
- 378 Yaseen, M. A. *et al.* (2001) Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-
379 like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in
380 preimplantation bovine embryos derived from different *in vitro* systems. *Reproduction*, v. 122,
381 n. 4, p. 601-610.

Figure 1

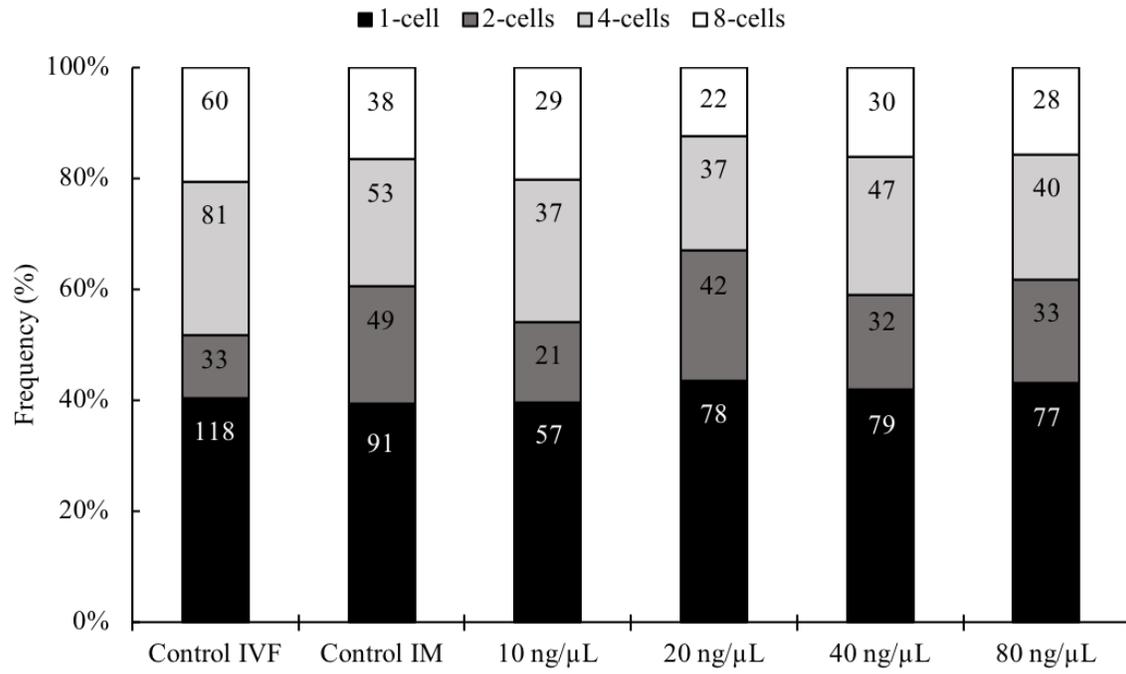


Figure 2

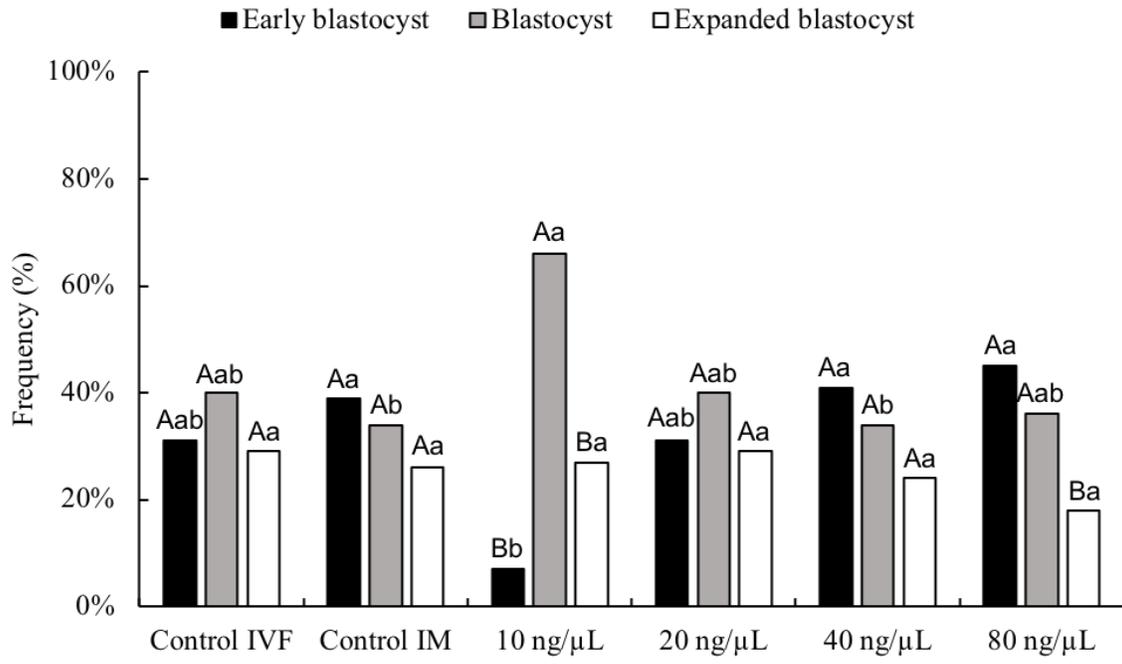


Figure 3

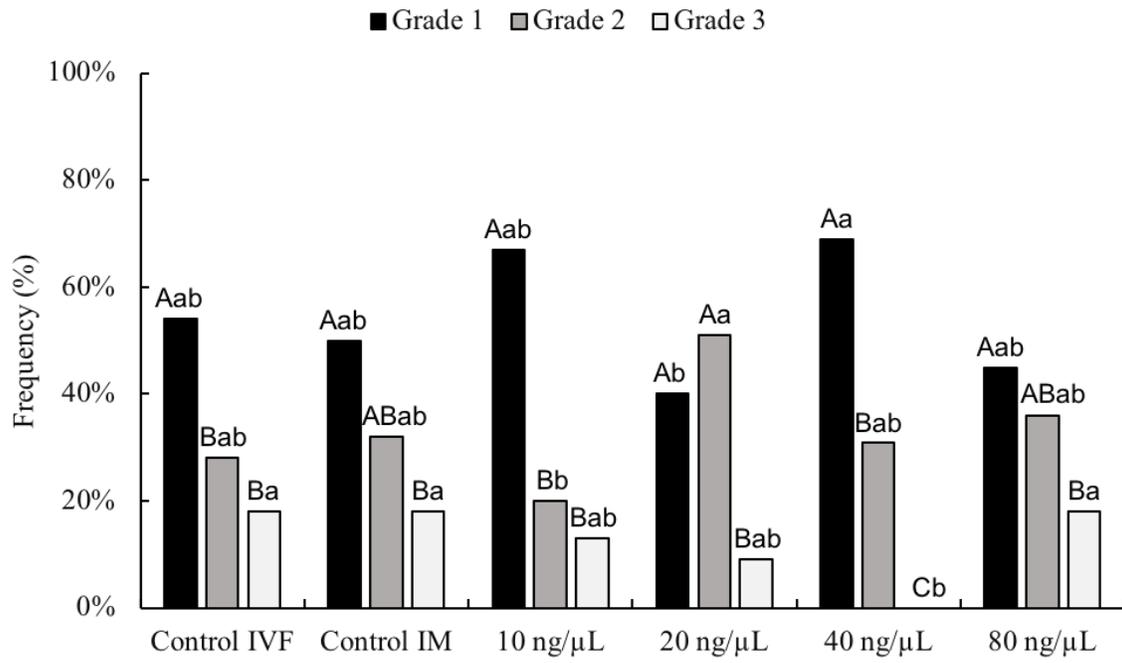


Figure 4

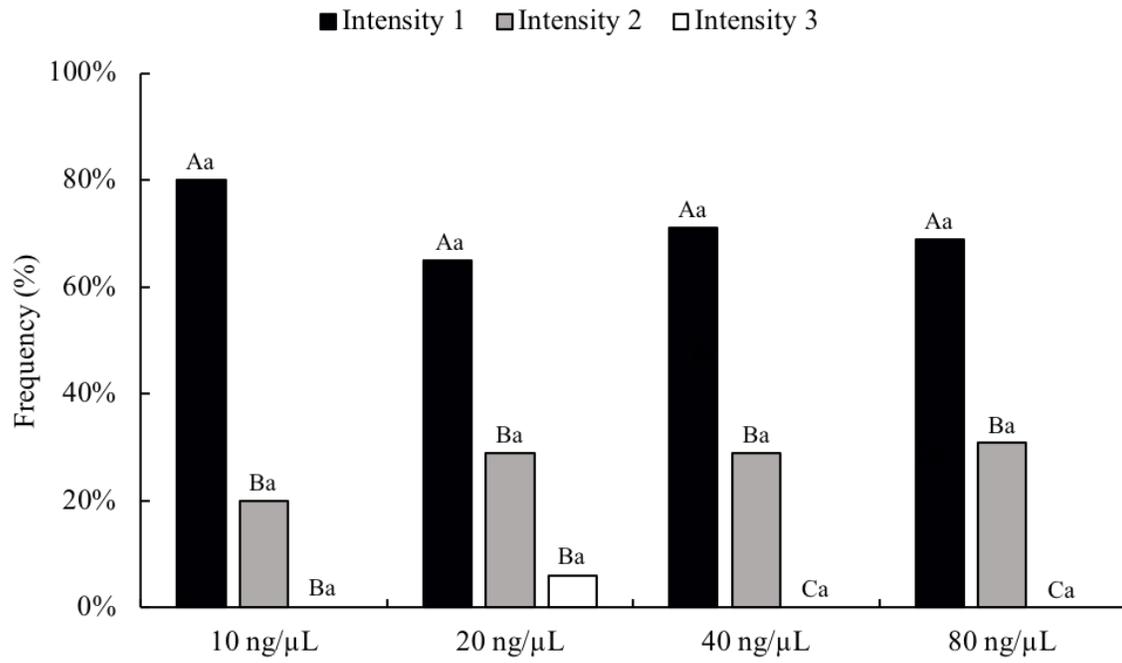


Figure 5

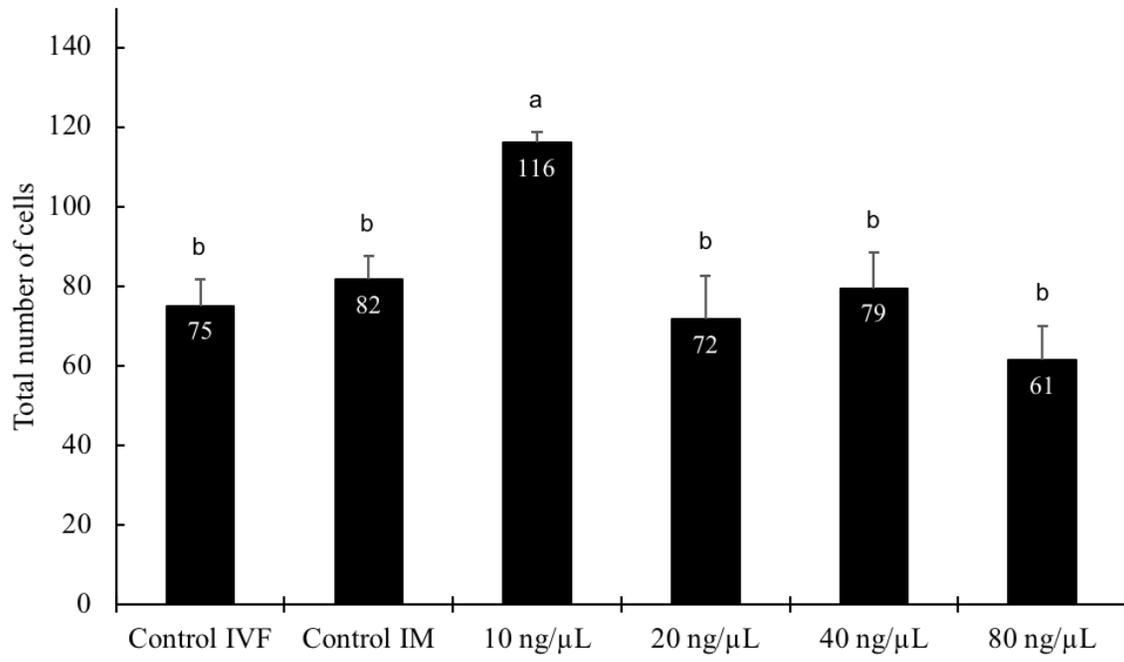


Table 1. Survival and cleavage rates on Day 2 and blastocyst rates on Day 7 of development of IVF-derived bovine embryos following intracytoplasmic microinjection (IM) at the 1-cell stage embryo on Day 1 of development

Experimental groups	IGF2 expression vector dose (ng/ μ L)	COCs (IVF) n	Survival rate after IM (IVC)		Cleavage rate		Blastocyst rate			Fluorescence rate	
			n	%	n	%*	n	%*	%**	n	%
Nonmicroinjected embryos	-	292	-	-	174	59.6 ^a	68	23.3 ^a	39.1 ^a	0	0.0
Microinjected embryos	0	266	231	86.8 ^a	140	60.6 ^a	38	16.5 ^{ab}	27.1 ^{bc}	0	0.0
	10	161	144	89.4 ^a	87	60.4 ^a	15	10.4 ^c	17.2 ^d	10	66.7 ^a
	20	203	179	88.2 ^a	101	56.4 ^a	35	19.6 ^{ab}	34.7 ^{ab}	17	48.6 ^a
	40	211	187	88.6 ^a	108	57.8 ^a	30	16.0 ^{ab}	27.8 ^{abc}	17	56.7 ^a
	80	211	178	84.4 ^a	101	56.7 ^a	22	12.4 ^{bc}	21.8 ^{cd}	13	59.1 ^a

^{a,b}: Different superscripts in the same column differ, for $P < 0.05$.

*Cleavage rates and blastocyst rates based on the total number of embryos in IVC, for the nonmicroinjected control group, and on the total number of embryos that survived microinjection, per microinjected group.

**Blastocyst rates based on total number of cleaved embryos on Day 2 of IVC, per group.

Table 2. Probability outcomes and relative efficiency for survival after microinjection (MI), development to the blastocyst stage, positive GFP fluorescence, and development to more advanced stages of development (stages 6 and 7) with better morphological quality (grade 1) by experimental group, from the total number of COCs used for IVF in each group

Experimental groups	IGF2 expression vector dose (ng/ μ L)	COCs (IVF) n	Probability					Relative efficiency (ratio)*
			Survival after IM (IVC)	Blastocyst development	Positive GFP fluorescence	Stages 6 and 7	Grade 1	
Nonmicroinjected embryos	-	292	-	0.233	-	0.690	0.540	0.087 ^a (1:11)
	0	266	0.868	0.165	-	0.600	0.500	0.043 ^{ab} (1:23)
Microinjected embryos	10	161	0.894	0.104	0.667	0.930	0.670	0.039 ^{ab} (1:26)
	20	203	0.882	0.196	0.486	0.690	0.400	0.023 ^b (1:43)
	40	211	0.886	0.160	0.567	0.600	0.700	0.034 ^b (1:29)
	80	211	0.844	0.124	0.591	0.550	0.450	0.015 ^b (1:67)

^{a,b}: Different superscripts in the same column differ, for $P < 0.05$.

*Relative efficiency to obtain a grade-1 GFP-fluorescent blastocyst (stage 6) or expanded blastocyst (stage 7) on Day 7 of development. Ratio refers to the number of COCs necessary to obtain a grade-1 GFP-fluorescent stage 6 or 7 on Day 7 of development. Determination of relative efficiency and ratio did not include data on survival after MI and positive GFP fluorescence for the nonmicroinjected control group, or positive GFP fluorescence for the group microinjected only with TE buffer (0 ng/ μ L).

- Figure 1. Proportion (%) of embryo stages of development (1-, 2-, 4-, and 8-cell stage embryos) on Day 2 of development of IVF-derived bovine embryos, per experimental group. Numbers within each column represent the actual total number of embryos per stage of development, per group.
- Figure 2. Distribution of embryo stage (Stage 5: early blastocyst; Stage 6: blastocyst; Stage 7: expanded blastocyst) for IVF-derived bovine embryos on Day 7 of development, per experimental group. ^{a,b}: Columns without common superscripts between groups differ, for $P < 0.05$. ^{A,B}: Columns without common superscripts within each group differ, for $P < 0.05$.
- Figure 3. Distribution of embryo quality (Grade 1: excellent; Grade 2: good; Grade 3: poor) for IVF-derived bovine embryos on Day 7 of development, per experimental group. ^{a,b}: Columns without common superscripts between groups differ, for $P < 0.05$. ^{A,B}: Columns without common superscripts within each group differ, for $P < 0.05$.
- Figure 4. Fluorescence level by intensity (low, medium, high) in Day-7 bovine IVP blastocysts following intracytoplasmic microinjection with distinct IGF2 expression vector doses in 1-cell stage embryos. ^{a,b}: Columns without common superscripts between groups differ, for $P < 0.05$. ^{A,B}: Columns without common superscripts within each group differ, for $P < 0.05$.
- Figure 5. Total cell numbers (means \pm s.e.m) for IVF-derived bovine embryos on Day 7 of development, per experimental group. ^{a,b}: Columns without common superscripts differ, for $P < 0.05$.

5. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados observados neste estudo, é possível concluir que:

- a) A microinjeção citoplasmática em embriões no estágio de 1-célula não comprometeu o desenvolvimento embrionário *in vitro* subsequente dos embriões que sobreviveram ao processo.
- b) Embriões bovinos em estádios pré-implantacionais expressaram o gene *IGF2* bovino de forma epissomal transitente, com base na expressão do gene repórter (GFP), com 58% de fluorescência positiva em blastocistos derivados de embriões microinjetados.
- c) Quando avaliado o desenvolvimento embrionário *in vitro*, e independente dos grupos experimentais, a microinjeção de embriões com o vetor de expressão epissomal para o *IGF2* não causou efeito quantitativo ou qualitativo diferente dos controles.
- d) Embriões resultantes do grupo de microinjeção citoplasmática de 10 ng/ μ L apresentaram características de maior cinética de desenvolvimento e melhor qualidade morfológica quando comparados aos do grupo controle, a despeito de uma menor taxa de desenvolvimento ao estágio de blastocisto, o que indica um possível efeito promotor do crescimento do gene *IGF2* no desenvolvimento de embriões bovinos de PIV, do estágio de 1-célula até blastocisto.

6. PERSPECTIVAS

As perdas embrionárias dos embriões bovinos PIV são enfaticamente atribuídas a anormalidades de desenvolvimento após certas manipulações embrionárias *in vitro*. Dentro disso, as alterações fenotípicas de tamanho são os principais achados de estudos durante o desenvolvimento embrionário. Dessa forma, estudos como este enfocados em genes responsáveis pelo crescimento pré-natal são essenciais para o entendimento da biologia do desenvolvimento e da etiologia das anormalidades. O ligante *IGF2* e seu receptor *IGF2R* se fazem importantes nesse processo, e para tal, a manipulação destes elementos pode trazer futuras modulações no desenvolvimento embrionário e fetal após a PIV de embriões bovinos. Desse modo, este trabalho realizado durante o Mestrado Acadêmico no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS possui, ainda, etapas já encaminhadas e prontas a serem desenvolvidas a fim da complementação dos dados apresentados nesta dissertação. Estes resultados poderão esclarecer com mais embasamento estes aspectos sobre os problemas na PIV de embriões bovinos, de caráter importante no subdesenvolvimento embrionário inicial qual leva à morte e, conseqüentemente, a perdas gestacionais.

Há a perspectiva de conduzir-se um *knockdown* para o gene *IGF2R* usando ds-siRNAs (*IDT Integrated DNA Technologies*) específicos ao receptor e com três diferentes sequências, os quais estão sendo avaliados no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução da FAVET/UFRGS, tendo uma eficiência esperada de pelo menos 70% de *knockdown*. Depois, a combinação do *knockdown* para o receptor *IGF2R* juntamente com o aumento da expressão do *IGF2*, deverá demonstrar efeitos mais enfáticos sobre o desenvolvimento *in vitro*. Todos estes procedimentos serão desenvolvidos conforme a técnica de microinjeção intracitoplasmática no estágio de 1-célula, já estabelecida e apresentada nesta dissertação.

Visto que em média 58% de todos os embriões microinjetados com o vetor episomal neste estudo foram positivos para o GFP, será necessário investigar se naqueles não fluorescentes a técnica de microinjeção não foi efetiva, se a taxa de expressão foi abaixo do limiar físico de visualização da fluorescência, ou se os embriões já não estavam mais sob efeito da expressão do vetor episomal no Dia 7 de desenvolvimento. Para tanto, será necessário realizar coleta e quantificação da expressão dos genes *IGF2* e GFP nos Dias

2, 5 e 7 de desenvolvimento dos embriões microinjetados com o vetor de expressão episomal (produzidos como neste estudo).

Em aspectos práticos, embriões no Dia 7 de desenvolvimento tratados com a combinação do *knockdown* para o *IGF2R* juntamente com o aumento da expressão do *IGF2* poderão ser transferidos para fêmeas bovinas sincronizadas, para então no Dia 14 de desenvolvimento realizar a coleta dos conceptos a fim de avaliá-los morfológicamente, comparando-os aos controles não tratados. Todas serão oportunidades que podem trazer novas estratégias para um melhor entendimento do desenvolvimento embrionário e fetal, especialmente na PIV de embriões bovinos pela FIV.

7. REFERÊNCIAS

ANDREW FIRE, SIQUN XU, MARY K. MONTGOMERY, STEVEN A. KOSTAS, S. E. D. & C. C. M. **Letters to Nature** v. 391, p. 806–811, 1998.

ANSARI, H. A. *et al.* Regional assignment of conserved reference *loci* anchors unassigned linkage and syntenic groups to ovine chromosomes. **Genomics**, v. 24, n. 3, p. 451–455, 1994.

BAKER, J. *et al.* Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. **Cell**, v. 75, n. 1, p. 73–82, 1993.

BARLOW, D. P. *et al.* The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is *imprinted* and closely linked to the Tme locus. **Nature**, v. 349, n. 6304, p. 84–87, 1991.

BARTOLOMEI, M. S. *et al.* Epigenetic mechanisms underlying the *imprinting* of the mouse H19 gene. **Genes & Development**, v. 7, n. 9, p. 1663–1673, 1993.

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

BATCHELDER, C. A. *et al.* Perinatal Physiology in Cloned And Normal Calves: Hematologic And Biochemical Profiles. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, n. 1, p. 83–96, 2007.

BELIZARIO, J. E. *et al.* New routes for transgenesis of the mouse. **Journal of Applied Genetics**, v. 53, n. 3, p. 295–315, 2012.

BERTOLINI, M.; ANDERSON, G. The placenta as a contributor to production of large calves. **Theriogenology**, v. 57, n. 01, p. 181-187, 2002.

BERTOLINI, L. R.; BERTOLINI, M. RNA Interference in Animal Biotechnology. 2009.
BERTOLINI, M. *et al.* Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, n. 3, p. 318–328, 2002a.

BERTOLINI, M. *et al.* Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. **Theriogenology**, v. 58, n. 5, p. 973–994, 2002b.

BERTOLINI, M. *et al.* Evidence of increased substrate availability to *in vitro*-derived bovine foetuses and association with accelerated conceptus growth. **Reproduction**, v. 128, n. 3, p. 341–354, 2004.

BERTOLINI, M. *et al.* Developmental problems during pregnancy after *in vitro* embryo manipulations Problemas gestacionais decorrentes das manipulações embrionárias *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 391–405, 2007.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, n. 1, p. 54–62, 1995.

BRISSENDEN, J. E.; ULLRICH, A.; FRANCKE, U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. **Nature**, v. 310, n. 5980, p. 781–784, 1984.

CAVAZZANA-CALVO, M. *et al.* Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. **Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine**, v. 7, n. 3, p. 259–260, 2000.

CHAO, W.; D'AMORE, P. A. IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 2, p. 111–120, 2008.

CHAVATTE-PALMER, P. *et al.* Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 829–840, 2006.

CHAVATTE-PALMER, P. *et al.* Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. **Placenta**, v. 33 Suppl, p. S99–S104, 2012.

CONSTANCIA, M. *et al.* Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 945–948, 2002.

DECHIARA, T. M.; ROBERTSON, E. J.; EFSTRATIADIS, A. Parental *imprinting* of the mouse insulin-like growth factor II gene. **Cell**, v. 64, n. 4, p. 849–859, 1991.

DISKIN, M. G. *et al.* Pregnancy losses in cattle: Potential for improvement. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 1–2, p. 83–93, 2016.

DOBBS, K. B. *et al.* Dynamics of DNA Methylation during Early Development of the Preimplantation Bovine Embryo. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

EDWARDS, R. G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, v. 208, p. 349–351.

ELLIS, S. A. Immune status: normal expression of MHC class I in the placenta and what is expected in clones. **Cloning and Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 121–125, 2004.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 178–191, 2006.

FIRTH, S. M.; BAXTER, R. C. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 6, p. 824–854, 2002.

FREEMAN, W. H. **Molecular Cell Biology**, v.4, Cap. 7: Recombinant DNA and Genomics, p. 456-479, 2000.

FUJIMORI, T. *et al.* Morphological organization of the mouse preimplantation embryo. **Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 16, n. 2, p. 171–177, 2009.

GARCIA, J. M.; AVELINO, K. B.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, v. 1, p. 201, 2005.

GARDNER, D. K.; LANE, M.; WATSON, A. J. A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo. **Molecules**, p. 432, 2004.

GEISERT, R. D.; BAZER, F. W. In *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology: Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals*. Cap. 7, p. 105-136, 2015.

GERGER, R. P. C. *et al.* Impact of cumulative gain in expertise on the efficiency of handmade cloning in cattle. **Theriogenology**, v. 95, p. 24–32, 2017.

Gonçalves P. B. *et al.* **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Editora Roca, 2008.

GOODALL, J. J.; SCHMUTZ, S. M. Linkage mapping of IGF2 on cattle chromosome 29. **Animal genetics**, v. 34, n. 4, p. 313, 2003.

GRAF, A. *et al.* Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 1–2, p. 46–58, 2014.

HAGEMANN, L. J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. **Theriogenology**, v. 51, n. 2, p. 449–459, 1999.

HALL, V. J.; RUDDOCK, N. T.; FRENCH, A. J. Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine *in vivo*, *in vitro*, and nuclear transfer blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, n. 1, p. 16–24, 2005.

HEINZMANN, J. *et al.* Epigenetic profile of developmentally important genes in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 3, p. 188–201, 2011.

HENDRIKSEN, P. J. M. *et al.* Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 11–20, 2000.

BARRETA, M. H. *et al.* Homologous recombination and non-homologous end-joining repair pathways in bovine embryos with different developmental competence. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 16, p. 2049–2058, 2012.

HILL, J. R. *et al.* Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, v. 51, n. 8, p. 1451–1465, 1999.

- HILL, J. R. *et al.* Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 1, p. 55–63, 2002.
- HYTTEL, P. *et al.* **Essentials of Domestic Animal Embryology**. Elsevier Health Sciences, 2009. (ainda não achei as paginas vou procurar)
- HOLZENBERGER, M. *et al.* IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. **Nature**, v. 421, n. 6919, p. 182–187, jan. 2003.
- IQBAL, K. *et al.* Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos. **BioTechniques**, v. 47, n. 5, p. 959–968, 2009.
- JOUNEAU, A. *et al.* Developmental abnormalities of NT mouse embryos appear early after implantation. **Development (Cambridge, England)**, v. 133, n. 8, p. 1597–1607, abr. 2006.
- KEMPISTY, B. *et al.* Expression of INHbetaA and INHbetaB proteins in porcine oocytes cultured *in vitro* is dependent on the follicle size. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 23, n. 2, p. 205–211, 2015.
- KEOWN, W. A., CAMPBELL, C. R., and KUCHERLAPATI, R. S. Methods for introducing DNA into mammalian cells. **Methods in Enzymology 185: Gene Expression Technology**, v.17, p. 527–537, 1990.
- LAU, M. M. *et al.* Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. **Genes & Development**, v. 8, n. 24, p. 2953–2963, 1994.
- LE ROITH, D.; SCAVO, L.; BUTLER, A. What is the role of circulating IGF-I? **Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM**, v. 12, n. 2, p. 48–52, 2001.
- LEMLEY, C. O.; VONNAHME, K. A. Physiology and endocrinology symposium: Alterations in uteroplacental hemodynamics during melatonin supplementation in sheep and cattle. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 5, p. 2211–2221, 2017.
- LIU, J. H. *et al.* Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 4, p. 598–607, 2008.
- LONERGAN, P. *et al.* Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Reproduction**, v. 117, n. 1, p. 159–167, 1999.
- LONERGAN, P. *et al.* Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 41, n. 5, p. 427–437, 2001.
- LOPES, A. C. *et al.* Differential expression of insulin-like growth factor family members in immature *cumulus*–oocyte complexes from dairy cows with different genotypes.

Reproduction in Domestic Animals, v. 52, n. 6, p. 1067–1073, 2017.

LOUVI, A.; ACCILI, D.; EFSTRATIADIS, A. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. **Developmental Biology**, v. 189, n. 1, p. 33–48, 1997.

LUDWIG, T. *et al.* Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds. **Developmental Biology**, v. 177, n. 2, p. 517–535, 1996.

LUNDSTROM, K. **New Era in Gene Therapy**. Elsevier Inc., Cap. 2, p. 21-27, 2015.

MACHATKOVA, M. *et al.* Developmental competence of bovine oocytes: Effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 61, n. 2–3, p. 329–335, 2004.

MACHATKOVÁ, M. *et al.* Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 801–810, 1996.

MIGLINO, M. A. *et al.* Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v. 68, n. 4, p. 604–617, 2007.

MOORE, K. *et al.* Insulin-like growth factor (IGF) family genes are aberrantly expressed in bovine conceptuses produced *in vitro* or by nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 68, n. 5, p. 717–727, 2007.

MOORE, T.; HAIG, D. Genomic *imprinting* in mammalian development: a parental tug-of-war. **Trends in Genetics : TIG**, v. 7, n. 2, p. 45–49, 1991.

NEZER, C. *et al.* An *imprinted* QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the *IGF2 locus* in pigs. **Nature Genetics**, v. 21, n. 2, p. 155, 1999.

O'DOHERTY, A. M. *et al.* DNA methylation dynamics at imprinted genes during bovine pre-implantation embryo development. **BMC Developmental Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015.

OHNO, M.; AOKI, N.; SASAKI, H. Allele-specific detection of nascent transcripts by fluorescence *in situ* hybridization reveals temporal and culture-induced changes in *Igf2 imprinting* during pre-implantation mouse development. **Genes to Cells**, v. 6, n. 3, p. 249–259, 2001.

PAVELIC, J.; MATIJEVIC, T.; KNEZEVIC, J. Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 125, n. 4, p. 511–522, 2007.

PETER, A. T. Bovine placenta: A review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, p. 693–705, 2013.

- PONTES, J. H. F. *et al.* Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690–697, 2009.
- RAMAMOORTH, M.; NARVEKAR, A. Non viral vectors in gene therapy - An overview. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 1, p. GE01-GE06, 2015.
- REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Utero-placental vascular development and placental function. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 6, p. 1839–1851, 1995.
- REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the placenta. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 4, p. 1033–1040, 2001.
- SATRAPA, R. *et al.* Differential expression of igf family members in heat-stressed embryos produced *in vitro* from opu-derived oocytes of nelore (*bos indicus*) and holstein (*bos taurus*) cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 6, p. 1043–1048, 2013.
- SAWAI, K. Studies on gene expression in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 55, n. 1, p. 11–16, 2009.
- SCHATTEN, H.; CONSTANTINESCU, G. M. **Comparative Reproductive Biology**. John Wiley & Sons, v. 1, Cap. 6, p. 198-232, 2008.
- SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. Pullman: Current Conceptions, v. 2, Cap. 13, p. 284-303 2005,
- SEPULVEDA-RINCON, L. P. *et al.* Random Allocation of Blastomere Descendants to the Trophectoderm and ICM of the Bovine Blastocyst. **Biology of Reproduction**, v. 95, n. 6, p. 123–123, 2016.
- SIQUEIRA, L. G. B. *et al.* Postnatal phenotype of dairy cows is altered by *in vitro* embryo production using reverse X-sorted semen. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5899–5908, 2017.
- SIRARD, M. A. *et al.* Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006.
- SIRARD, M. A. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. **Reproduction**, v. 156, n. 1, R1-R7, 2018,
- SURANI, M. A.; BARTON, S. C. Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. **Science**, v. 222, n. 4627, p. 1034–1036, 1983.
- STRINGFELLOW D. A.; GIVENS, M. D. Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 4th ed. Champaign, IL: IETS, 2010

- SUTEEVUN-PHERMTHAI, T. *et al.* Allelic switching of the imprinted IGF2R gene in cloned bovine fetuses and calves. **Animal Reproduction Science**, v. 116, n. 1–2, p. 19–27, 2009.
- TAVARES, K. C. S. *et al.* Efficient RNAi-induced protein *knockdown* in somatic cells using diced or chemically produced small interfering RNAs (siRNA). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 3, p. 1–11, 2012.
- THOMPSON, J. G. Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 341–354, 1997.
- TORRES-PADILLA, M. E. *et al.* Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. **Nature**, v. 445, n. 7124, p. 214–218, 2007.
- URREGO, R. *et al.* Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. **Epigenectis**, v. 2294, p. 803–815, 2014.
- VANDEN MEERSCHAUT, F. *et al.* Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 28, n. 5, p. 560–571, 2014.
- WAKISAKA-SAITO, N. *et al.* Chorioallantoic placenta defects in cloned mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 349, n. 1, p. 106–114, 2006.
- WANG, Q.; SUN, Q. Y. Evaluation of oocyte quality: Morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2007.
- WELLS, D. N. *et al.* The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. **Cloning and Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 101–110, 2004.
- WOOD, A. J.; OAKEY, R. J. Genomic *imprinting* in mammals: Emerging themes and established theories. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 11, p. 1677–1685, 2006.
- WU, G. *et al.* Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 9, p. 2316–2337, 2006.
- YAN, L. *et al.* Efficacy of progesterone supplementation during early pregnancy in cows: A meta-analysis. **Theriogenology**, v. 85, n. 8, p. 1390–1398, 2016.
- YASEEN, M. A. *et al.* Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different *in vitro* systems. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 601–610, 2001.

YOUNG, L. E. *et al.* Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, n. 2, p. 153–154, 2001.