

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

IANA SALES CAMPELO

**EFEITO DA INCUBAÇÃO COM CROTAMINA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E EXPRESSÃO GÊNICA EM EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

**FORTALEZA
2013**

IANA SALES CAMPELO

EFEITO DA INCUBAÇÃO COM CROTAMINA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E EXPRESSÃO GÊNICA EM EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Carnívoros, Onívoros, Herbívoros e Aves

Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas

FORTALEZA
2013

C193e

Campelo, Iana Sales.

Efeito da incubação com crotamina sobre o desenvolvimento e expressão gênica em embriões bovinos produzidos *in vitro* / Iana Sales Campelo. — 2013.

CD-ROM 77f. : il. (algumas color.); 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências e Tecnologia, Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas.

Co-orientação: Prof^a. Dr^a. Alexsandra Fernandes Pereira.

1. Peptídeos de penetração celular. 2. Efeito embriotóxico. 3. Competência de desenvolvimento. I. Título.

CDD: 636.089

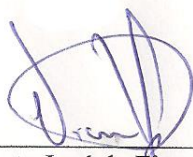
IANA SALES CAMPELO

**EFEITO DA INCUBAÇÃO COM CROTAMINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO E
EXPRESSÃO GÊNICA EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

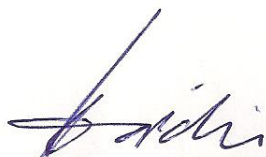
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias.

Aprovada em 09/07/2013

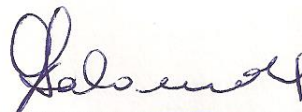
BANCA EXAMINADORA



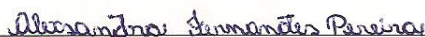
Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Orientador



Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista
Universidade Federal do Ceará – UFC
Examinador



Prof. Dr. Daniel Salamone
Universidade de Buenos Aires – UBA
Examinador



Profª. Dra. Alessandra Fernandes Pereira
Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA
Co-orientadora

A MINHA MÃE

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) por possibilitar minha formação acadêmica.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsas de pesquisa e pelo apoio financeiro ao projeto.

A minha mãe, por me ensinar a caminhar, levantar e andar de novo. As minhas tias, Daniela e Shirlene, por terem cuidado e cuidarem de mim como se minhas mães fossem. A minha vó Fátima, meu tio Epitácio, minha irmã Ingrid, meu irmão Gabriel e meus primos, Larissa, Daniel e Davi, por contribuírem, cada um da sua maneira, do seu jeitinho tão especial, com a minha vida. A minha irmã Joyce, por me aturar, me obrigar a aturá-la e por ser minha companheira de fuga. À colega Samira, por comandar as fugas.

Ao meu orientador Vicente José de Figueirêdo Freitas, pelas oportunidades e contribuições fornecidas, e por sempre ser um exemplo de responsabilidade, ética e dedicação ao trabalho.

A minha coorientadora e querida amiga, Alessandra Fernandes Pereira, pela presença, dedicação, caráter, paciência, ensinamentos profissionais e pessoais, que contribuíram grandemente com minha formação. À pesquisadora e colega, Luciana Magalhães Melo, por me mostrar a importância de desenvolver a investigação científica de forma correta e também prazerosa.

Ao grande amigo Agostinho Soares de Alcântara Neto, por ter sido sempre tão compreensivo, presente e acolhedor, desde meu ingresso ao laboratório, e por me mostrar que o altruísmo é uma característica a ser praticada diariamente.

Aos amigos de laboratório, Maria Cláudia dos Santos Luciano, Deisy Johanna Diaz Sanchez, Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista, Carlos Henrique Souza de Melo, Francisco Carlos de Sousa, Joanna Maria Gonçalves de Souza, Dowglish Ferreira Chaves, Amanda Albuquerque Rocha, Raylene Ramos Moura, Carla Rozilene Guimarães Silva Oliveira, Maiara Pinheiro Vieira, Talles Monte de Almeida, Carlos Eduardo Bastos Lopes, Flávio Carolino de Souza Filho, Murilo Torres de Melo Pedrosa, Bruna Raquel Cavalcante Barroso, Rodrigo Rabelo de Castro Sousa e Caique Teixeira Ramos, pela amizade e companheirismo nos momentos difíceis, nos momentos prazerosos e pela contribuição em diversos aspectos.

RESUMO

A crotamina é um peptídeo altamente básico presente no veneno da cascavel da América do Sul (*Crotalus durissus terrificus*) com capacidade penetrante em diversos tipos celulares. Contudo, sua atividade nunca havia sido testada em embriões bovinos. Portanto, neste estudo, complexos *cumulus*-oócito bovinos foram maturados e fecundados *in vitro* e os presumíveis zigotos foram incubados com crotamina em diferentes tempos e concentrações. Inicialmente, os mesmos foram incubados com crotamina 0,1 μ M durante 6 h, 12 h ou 24 h. Em experimento posterior, presumíveis zigotos foram incubados com crotamina 0,1 μ M, 1 μ M ou 10 μ M por 24 h. Os embriões foram submetidos a um cultivo *in vitro* por 8 dias e avaliados quanto ao desenvolvimento embrionário aos dias 3, 7 e 8 do cultivo. Além disso, no primeiro experimento, a contagem do número de blastômeros por blastocistos em D8 foi realizada. Em ambos os experimentos, blastocistos eclodidos em D8 foram analisados quanto à expressão dos genes *ATP1A1*, *AQP3*, *GLUT1* e *GLUT3*, relacionados à qualidade embrionária, por RT-PCR em tempo real. No primeiro experimento, a taxa de clivagem, taxa de produção de blastocistos (D7 e D8) e número de blastômeros por blastocisto não diferiram significativamente ($P > 0,05$) entre os grupos. Além disso, dentro de cada período de incubação, os níveis de expressão foram semelhantes ($P > 0,05$) em embriões cultivados com ou sem crotamina. No segundo experimento, apesar de o grupo incubado com crotamina 0,1 μ M ter apresentado uma redução na taxa de clivagem em comparação com o controle sem crotamina ($P < 0,05$), as taxas de produção de blastocistos em D7 e D8 não foram significativamente diferentes entre os grupos. Em relação à expressão, a utilização de concentrações de 0,1 e 10 μ M de crotamina não alteraram os níveis de RNAm, quando comparado com o controle ($P > 0,05$). Surpreendentemente, somente na concentração de 1 μ M de crotamina, tanto *ATP1A1* quanto *AQP3* diminuíram suas expressões em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Desta forma, conclui-se que mesmo submetidos à incubação com concentração de crotamina tão alta quanto 10 μ M por 24 h, apesar de apresentarem diferenças na expressão de alguns genes, os embriões não tiveram seu desenvolvimento prejudicado. Portanto, a incubação com crotamina nas faixas de tempo e concentração testadas podem ser aplicada durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos e futuros testes em transgênese.

Palavras-chave: Peptídeo de penetração celular. Efeito embriotóxico. Competência de desenvolvimento.

ABSTRACT

Crotamine is a highly basic peptide presented in the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) with penetrant capacity in several cells. However, your activity has never been tested in bovine embryos. Therefore, in this study, bovine *cumulus*-oocyte complexes were *in vitro* matured and fertilized and the presumable zygotes were incubated with crotamine for different times and concentrations. Initially, they were incubated with crotamine 0.1 μ M for 6 h, 12 h or 24 h. At further experiment, presumable zygotes were incubated with crotamine 0.1 μ M, 1 μ M or 10 μ M for 24 h. Embryos were subjected to *in vitro* culture for 8 days and were evaluated for embryo development at days 3, 7 and 8 of culture. Besides, at first experiment, cell number per blastocyst at D8 was assessed. In both experiments, hatched blastocysts at D8 were assessed regarding to expression of *ATP1A1*, *AQP3*, *GLUT1*, and *GLUT3* genes, related to embryo quality, by real-time RT-PCR. At first experiment, cleavage rate, blastocysts rates production (D7 and D8) and cell number per blastocyst did not differ significantly ($P > 0.05$) among groups. Moreover, within each incubation time, expression levels were similar ($P > 0.05$) in embryos cultured with or without crotamine. At second experiment, although the crotamine 0.1 μ M incubated group has presented a reduction cleavage rate in comparison with control without crotamine ($P < 0.05$), blastocysts rates production at D7 and D8 were not significantly different among the groups. Concerning to expression, the use of 0.1 and 10 μ M crotamine concentrations did not alter mRNA levels when compared to control ($P > 0.05$). Remarkably, only at the concentration of 1 μ M crotamine, both *ATP1A1* and *AQP3* decreased their expressions relative to control group ($P < 0.05$). For this, we conclude that even subjected to incubation with crotamine concentration as high as 10 μ M for 24 h, although presenting differences in expression of some genes, embryos did not have development impaired. Therefore, crotamine incubation at time and concentration ranges tested could be applied during *in vitro* culture of bovine embryos and further test for transgenesis.

Keywords: Cell penetration peptide. Embryotoxic effect. Developmental competence.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1 – Diferentes métodos para produzir animais transgênicos. (1) Transfecção gênica por meio de microinjeção pró-nuclear ou intracitoplasmática em embriões; (2) Transfecção de DNA por meio de um elemento de transposição, ou *transposon*: o elemento de transposição, que contem o gene de interesse, é microinjetado no pró-núcleo; (3) Transfecção gênica por meio de vetor lentiviral: o vetor lentiviral, que contem o gene de interesse, é injetado entre a zona pelúcida e a membrana do oócito ou embrião; (4) Transfecção gênica por meio de espermatozoide: o espermatozoide é incubado com o gene exógeno e microinjetado no citoplasma do oócito para fecundação por ICSI; (5) Transfecção gênica por meio de células pluripotentes: DNA é introduzido em linhagens de células pluripotentes. As células pluripotentes contendo DNA são injetadas em embriões para gerar animais quiméricos abrigando o gene exógeno em apenas algumas células (adaptado de HOUDEBINE, 2009) 23

Figura 2 – Absorção *in vitro* de crotamina-Cy3 em blastocisto em desenvolvimento. (A–C). Sinal fluorescente forte observado no interior da massa celular interna do blastocisto (asterisco). (A) = microscopia confocal de fluorescência (MCF); (B) = contraste de interferência digital (CID); (C) = sobreposição de MCF + CID; ampliação 250× (KERKIS et al., 2004) 26

Figura 3 – Mecanismo de penetração celular da crotamina. Uma vez que a crotamina esteja presente na matriz extracelular (1) ela (positivamente carregada) interage eletrostaticamente com os PGSH da membrana plasmática (negativamente carregados), (2) complexo de crotamina e PGSH são endocitados em vesículas, que são transportadas dentro do citoplasma, (3) essas vesículas se fundem aos endossomos/lisossomo, (4) a crotamina se acumula dentro do lipossomo até ser liberada no citosol. Uma vez que a crotamina esteja presente no citosol, ela interage com os centríolos e adentra o núcleo (5), interagindo com os cromossomos (KERKIS et al., 2010) 27

Capítulo 1

Figura 1 – Effect of crotamine incubation time on gene expression of *in vitro* produced bovine embryos. Quantification of *ATP1A1*, *AQP3*, *GLUT1* and *GLUT3* transcripts were performed by qPCR using *GAPDH* and *H2A* as reference genes. The IVF group was used as calibrator. Comparisons were made between groups within each incubation time (a,b: $P < 0.05$) or for each group vs IVF (A,B: $P < 0.05$) 54

Figura 2 – Effect of crotamine concentration on gene expression of *in vitro* produced embryos. Quantification of *ATP1A1*, *AQP3*, *GLUT1* and *GLUT3* transcripts were performed by qPCR using *GAPDH* and *H2A* as reference genes. The vehicle group (0 μ M crotamine) was used as calibrator. Bars with different superscripts (a,b) are significantly different at $P < 0.05$ 55

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1 – Comparação do tempo requerido para obter proteínas recombinantes em diferentes espécies de mamíferos transgênicos	22
---	----

Capítulo 1

Tabela 1 – Oligonucleotides used for qPCR analysis of gene expression in <i>in vitro</i> produced bovine embryos	50
---	----

Tabela 2 – Effect of incubation time with crotamine on development of <i>in vitro</i> produced bovine embryos	51
--	----

Tabela 3 – Effect of crotamine concentration on development of <i>in vitro</i> produced bovine embryos	52
---	----

Tabela 4 – Standard curve parameters for validation of qRT-PCR amplifications in bovine embryos	53
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Porcentagem

@ – Arroba

°C – Grau Celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

ANOVA – Análise de Variância

AQP3 – Aquaporina-3

ATP1A1 – Sódio/potássio ATPase subunidade alfa-1

Av. – Avenida (*avenue*)

Bp – Par de bases (*base par*)

BSA – Albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*)

CA – California

Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CHO – Ovário de hamster chinês (*chinese hamster ovary*)

COC – Complexo *cumulus*-oócito (*Cumulus-oocyte complexes*)

cDNA – DNA complementar (*complementary DNA*)

CID – Contraste de interferência digital

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO₂ – Dióxido de carbono

cm – Centímetro

CPP – *Cell-penetrating peptides*

CR2aa – Charles Rosenkrans 2 aminoácidos

Cq – Ciclo de quantificação (*quantification cycle*)

Ct – Limiar do ciclo (*cycle threshold*)

Cy3 – Cianina 3

D – Dia

Da – Dalton

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*desoxirribonucleic acid*)

dNTP – Deoxirribonucleotídeo trifosfato (*deoxyribonucleotide triphosphates*)

Dr. – Doutor (*doctor*)

Ecad – Caderina epitelial (*Epithelial cadherin*)

E – Eficiência (*efficiency*)

EGF – Fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor*)

EGFP – Proteína Fluorescente Verde Melhorada (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)

Et al. – *Et alii* (e outros)

FCS – Soro fetal bovino (*foetal calf serum*)

Fert-TALP – Fecundação-TALP (*fertilization-TALP*)

FSH – Hormônio Folículo Estimulante (*follicle-stimulating hormone*)

FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

G2 – Crescimento 2 (*Growth 2*)

G6PD – Glicose-6-fosfato 1-desidrogenase (*Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase*)

GAGSH – Glicosaminoglicanos de sulfato de heparan

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

GLUT1 – Transportador de glicose tipo 1

GLUT3 – Transportador de glicose tipo 3

GLUT 4 – Transportador de glicose tipo 4

h – Hora

H2A – Histona H2A (*histone H2A*)

HCT166 – Carcinoma de cólon humano (*Human colon carcinoma 166*)

Hpi – Horas pós-inseminação (*hours post insemination*)

HSF1 – Proteína de choque térmico fator 1 (*Heat shock factor 1 protein*)

HSPG – *Heparan Sulfate Proteoglycan*

ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (*Intracytoplasmic sperm injection*)

IFNT, IF τ – Interferon *tau*

IVF – Fecundação *in vitro* (*in vitro fertilization*)

IVM – Maturação *in vitro* (*in vitro maturation*)

IVP – Produção *in vitro* (*in vitro production*)

K⁺ – Potássio

kg – Quilograma

KRT8 – Queratina de citoesqueleto 8 (*Keratin cytoskeletal 8*)

LH – Hormônio luteinizante (*luteinizing hormone*)

m – Massa

M – Mitose

MCF – Microscopia confocal de fluorescência

MCI – Massa celular interna

MD – Maryland

min – Minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

MO – Missouri

Mr. – Senhor (*mister*)

mRNA – RNA mensageiro (*messenger RNA*)

Na/K; Na/K ATPase – Sódio/potássio ATPase

Na⁺ – Sódio

NaCl – Cloreto de sódio

No. – número

ng – Nanograma

NY – New York

pAntp – peptídeo *Antennapedia*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

PGK1 – Fosfoglicerato cinase 1 (*Phosphoglycerate kinase 1*)

PGSH – Proteoglicanos de sulfato de heparan

pH – potencial hidrogeniônico

PLAC8 – Proteína específica de placenta gene 8 (*Placenta-specific gene 8 protein*)

Plako – Placofilina (*plakophilin*)

PPC – Peptídeo de penetração celular

PPGCV – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Prof. – Professor

qPCR – PCR quantitativo (*quantitative PCR*)

R² – Linearidade

RNA – Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RT – Transcrição reversa (*reverse transcription*)

S – Síntese / Inclinação (*slope*)

s – segundo

SCNT – *Somatic cell nuclear transfer*

SD – Desvio padrão (*standard deviation*)

SH – Sulfato de heparan

St – *Saint*

TALP-H – Tyrode-HEPES lactato-piruvato-albumina (*HEPES-Tyrode's lactate-pyruvate-albumine*)

TAT HIV-1 – Proteína regulatória transativadora do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (*transactivating regulatory protein from human immunodeficiency virus type 1*)

TE – Trofotoderma

T_m – Temperatura de *melting* (*melting temperature*)

TNCS – Transferência Nuclear de Células Somáticas

U – unidade

UBA – Universidade de Buenos Aires

UECE – Universidade Estadual do Ceará

UFC – Universidade Federal do Ceará

USA – Estados Unidos da América (*United States of America*)

vs – *versus*

V/v – Volume/volume (*volume/volume*)

W/v – Peso/volume (*weight/volume*)

WI – Wisconsin

ZO-1 – Proteína ocludente da zona 1 (*zonula occludens protein-1*)

ZP – Zona pellucida (*zona pellucida*)

α – Alfa

β – Beta

Δ – Delta

κ – Kappa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 TRANSGÊNESE EM RUMINANTES	19
2.1.1 Importância e aplicações da transgênese	20
2.1.2 Métodos para obtenção de ruminantes transgênicos	21
2.1.2.1 Alternativas para produção de ruminantes transgênicos	22
2.2 PEPTÍDEOS DE PENETRAÇÃO CELULAR (PPCs)	24
2.2.1 Principais PPCs	24
2.2.2 Crotamina	25
2.2.2.1 Agente de penetração celular	26
2.2.2.2 Mecanismo de internalização	27
2.2.2.3 Agente de transfecção	28
2.3 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	29
2.3.1 Expressão gênica no embrião bovino	30
3 JUSTIFICATIVA	32
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	33
5 OBJETIVOS	34
5.1 OBJETIVO GERAL	34
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
6 CAPÍTULO 1	35
7 CONCLUSÕES	56
8 PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

APÊNDICES 65

 APÊNDICE A 65

 APÊNDICE B 67

 APÊNDICE C 69

 APÊNDICE D 71

 APÊNDICE E 73

 APÊNDICE F 75

1 INTRODUÇÃO

A transgênese animal tem possibilitado o avanço científico e tecnológico em diversos campos da ciência, a partir da possibilidade de realização de estudos em biomedicina, obtenção de animais de interesse zootécnico modificados, produção de órgãos para xenotransplante e, principalmente, produção de substâncias de interesse farmacêutico (WHEELER; WALTERS; CLARK, 2003).

Animais transgênicos podem ser utilizados como biorreatores para a produção de proteínas recombinantes, apresentando vantagens em relação a outros sistemas, tais como cultivos de bactérias e células de mamíferos (NIEMANN; KUES, 2007). Contudo, a produção dessas proteínas utilizando mamíferos de produção não deve ser apenas possível, mas também deve ser economicamente viável.

Já foram produzidos mamíferos transgênicos de diferentes espécies, incluindo bovinos (KRIMPENFORT et al., 1991), caprinos (EBERT et al., 1991) e ovinos (HAMMER et al., 1985). Tradicionalmente, há dois principais métodos para a obtenção de mamíferos transgênicos: a microinjeção pró-nuclear e a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) transfectadas. Ambos os métodos têm suas vantagens e desvantagens, sendo a baixa eficiência dessas técnicas uma das principais desvantagens relatadas (NIEMANN; KUES, 2007).

Desta forma, melhorias que aumentem a eficiência dessas técnicas ainda são necessárias. Nesse contexto, o uso de peptídeos de penetração celular (PPCs) poderá tornar-se uma alternativa viável para a transfecção e, por conseguinte, produção de mamíferos transgênicos.

Os PPCs são moléculas que apresentam a habilidade singular de penetrar células eucarióticas (POON; GARIÉPY, 2007), por isso podem ser utilizadas como carreadores de agentes terapêuticos e moléculas de importância biológica para o interior de células (TORCHILIN, 2006).

Dentro da classe dos PPCs, há a crotamina, uma toxina presente no veneno de cascavéis da América do Sul *Crotalus durissus terrificus* (GONÇALVES; POLSON, 1947). A crotamina apresenta capacidade penetrante em diferentes tipos celulares e especificidade natural para células em proliferação (HAYASHI et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2012).

Algumas características configuram a crotamina como um importante PPC. Já foi relatado que o mecanismo de penetração dessa molécula é regulado pela presença de glicosaminoglicanos de sulfato de heparina/heparan (GAGSHs) na membrana celular e que a crotamina é capaz de transfectar células ligando-se eletrostaticamente a DNA plasmideal (NASCIMENTO et al., 2007). Além disso, essa molécula, quando presente no citosol da célula adentra o núcleo e interage com os cromossomos (KERKIS et al., 2004).

A partir disso, foi observada a possibilidade de formação de um complexo entre a crotamina e uma construção gênica de interesse para transfecção e, por conseguinte, produção de animais transgênicos. Desta forma, a utilização da crotamina deve ser estudada, visto que essa molécula pode vir a ser uma metodologia alternativa para a obtenção de animais transgênicos.

Alguns estudos avaliam o efeito citotóxico da crotamina em diferentes tipos celulares (HAYASHI et al., 2008, NASCIMENTO et al., 2012), contudo apenas um estudo descreve o desenvolvimento embrionário pré-implantacional após incubação com essa molécula (KERKIS et al., 2004), no qual foi vista ausência de embriotoxicidade. Assim, mais estudos avaliando os efeitos da crotamina sobre o desenvolvimento embrionário são necessários, a fim de que a crotamina possa ser futuramente utilizada para a obtenção de embriões transgênicos.

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar possíveis efeitos da exposição à crotamina em embriões bovinos íntegros produzidos *in vitro* sobre a cinética do desenvolvimento embrionário e expressão gênica dos embriões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRANSGÊNESE EM RUMINANTES

Um transgene pode ser conceituado como um gene que não pertence intrinsecamente ao organismo, mas é introduzido em seu genoma a partir de uma origem exógena (JUSTICE; SIRACUSA; STEWART, 2011). Em concordância, um animal transgênico é denominado como aquele que contenha sequências de DNA recombinante inseridas de forma estável em seu genoma. Esse DNA recombinante usualmente consiste em um promotor específico, um gene codificando a proteína de interesse e elementos regulatórios para acentuar ou reduzir a expressão gênica. Quanto à origem do transgene, ele pode ser derivado da mesma espécie ou de uma espécie diferente (KEEFER, 2004).

Existem duas estratégias distintas que determinam características fenotípicas de animais transgênicos. Uma delas é relativa ao ganho de um fenótipo, denominado *knock in* gênico, enquanto a outra se relaciona com a perda de característica fenotípica, chamado *knock out* gênico. A geração de animais *knock out* é mais complicada, podendo ser alcançada a partir de recombinação homóloga ou adição de uma nova sequência, por exemplo, pequenos RNAs de interferência. Por outro lado, a produção de animais *knock in* é alcançada a partir da adição de um gene exógeno de interesse (BACCI, 2007). Geralmente, mamíferos biorreatores para a produção de proteínas de interesse farmacêutico são gerados a partir de *knock in* gênico.

A produção dos primeiros mamíferos a terem genes exógenos inseridos em seu genoma data de 1974, a partir da microinjeção de DNA viral na blastocle de blastocistos murinos (JAENISCH; MINTZ, 1974). Em 1980, foram produzidos camundongos transgênicos por microinjeção pró-nuclear de um vetor plasmideal composto de segmentos de DNA viral (GORDON et al., 1980). Assim, foi visualizada a oportunidade para realização de diversos estudos em sistemas mamíferos através da tecnologia do DNA recombinante.

Já no ano de 1982, com a produção de camundongos transgênicos para o hormônio de crescimento, essa tecnologia encontrou aplicações biotecnológicas, como método para acelerar o crescimento animal, corrigir doenças genéticas e reproduzir genes importantes (PALMITER et al., 1982), sendo essencial para atrair o interesse econômico para essa biotecnologia. A aplicação em animais de produção iniciou-se em 1985, com a

produção de ovinos, leporinos e suínos transgênicos para o hormônio de crescimento (HAMMER et al., 1985), sendo ampliada, nos anos seguintes, para bovinos (KRIMPENFORT et al., 1991) e caprinos (EBERT et al., 1991).

Aplicações subsequentes da transgênese foram realizadas para a compreensão do funcionamento e mecanismo de regulação gênica, a partir da expressão de genes sob o controle de elementos regulatórios exógenos ou o direcionamento de um gene repórter de interesse (JUSTICE; SIRACUSA; STEWART, 2011), ou para geração de animais transgênicos com diversas características de interesse, sendo a principal delas a geração de biorreatores para a produção proteínas de interesse.

2.1.1 Importância e aplicações da transgênese

A tecnologia transgênica apresenta um grande papel científico e tecnológico, pois, além de fornecer informações importantes sobre o funcionamento dos genes, apresenta importantes aplicações para diversas áreas da ciência, como, por exemplo, para a pesquisa básica do desenvolvimento embrionário, regulação gênica, biomedicina e pecuária (WHEELER et al., 2003). Essas aplicações são possíveis a partir da produção de animais transgênicos secretando substâncias de interesse farmacêutico, a geração de animais com características zootécnicas de interesse, a produção de órgãos para xenotransplante, entre outros (NIEMANN; KUES, 2007).

Animais transgênicos podem ser produzidos para diferentes finalidades, por exemplo, camundongos transgênicos para o estudo das funções gênicas (JUSTICE; SIRACUSA; STEWART, 2011). Contudo, a aplicação dessa tecnologia em animais de produção tem sido limitada. Tal restrição ocorre principalmente devido ao encarecimento da pesquisa nessas espécies, sendo fatores importantes para tanto o alto custo de manutenção do rebanho e o longo intervalo entre gerações. Além disso, também são relatadas dificuldades inerentes à própria técnica (KEEFER, 2004).

Atualmente, a obtenção de animais de produção transgênicos tem atraído interesse para a aplicação comercial da transgênese. Essa metodologia apresenta uma importante vantagem em relação aos sistemas de cultivo em bactérias e células de mamíferos, devido à alta qualidade das proteínas produzidas, que apresentam maior similaridade com a proteína endógena (HOUDEBINE, 2009).

Alguns autores consideram a produção de proteínas recombinantes no leite a abordagem mais bem-sucedida em mamíferos transgênicos. Isso ocorre devido à praticidade de obter grandes volumes de leite e da relativa facilidade de extração da proteína a partir desse fluido corporal (HOUDEBINE, 2002; WHEELER et al., 2003).

Outra vantagem de produzir proteínas exógenas na glândula mamária seria o fato da molécula não circular pelo corpo do animal. Assim, as proteínas de interesse podem ser expressas na glândula mamária clonando seus genes em vetores que contenham promotores e elementos regulatórios específicos de genes que codifiquem proteínas expressas exclusivamente na glândula mamária, como, por exemplo, os promotores da κ -caseína e β -lactoglobulina (BODROGI et al., 2006; HOUDEBINE, 2002).

2.1.2 Métodos para obtenção de ruminantes transgênicos

Em ruminantes, duas técnicas têm sido predominantemente utilizadas para produzir animais transgênicos: microinjeção pró-nuclear (GORDON et al., 1980) e transferência nuclear de células somáticas (TNCS) transfectadas (SCHNIEKE et al., 1997).

Pela técnica de microinjeção pró-nuclear muitas cópias da construção gênica são injetadas diretamente no pró-núcleo de um oócito recém-fecundado. Se o transgene for incorporado durante a fase pró-nuclear, então todas as células do animal irão conter esse DNA exógeno. Entretanto, nem sempre o DNA é incorporado nesta fase, resultando em um animal mosaico, ou seja, com algumas células contendo o transgene e outras não (KEEFER, 2004).

Além disso, esse procedimento tem como característica a integração aleatória do transgene, geralmente várias cópias em tandem (curtas sequências repetidas de DNA), que variam em número entre as linhagens transgênicas (NIEMANN; KUES, 2000). Tal fator pode levar a uma ineficiência da técnica, pois não há garantia de que o animal irá expressar grandes quantidades da proteína (KEEFER, 2004).

A TNCS doadoras transgênicas pré-selecionadas supera algumas das desvantagens apresentadas pela microinjeção pró-nuclear e, assim, pode reduzir os custos para a obtenção de ruminantes transgênicos. Tendo em vista que a maioria das crias será transgênica, o número de receptoras necessárias em um programa de transgênese pode ser reduzido para a geração de um número equivalente de crias transgênicas produzidas por microinjeção pró-nuclear (BALDASSARRE et al., 2002).

Ainda pela TNCS transfectadas é possível caracterizar as células transgênicas quanto ao local de integração, número de cópias integradas e integridade do transgene antes da utilização para a TNCS. Nesse contexto, embora a capacidade de desenvolvimento dos embriões reconstruídos seja baixa, esse fato será compensado, pois a maioria das crias nascidas será transgênica (BALDASSARRE, 2004). Além disso, o uso de linhagens celulares transgênicas evita a ocorrência de animais mosaicos, pois todas as células, inclusive as células germinativas, serão geneticamente idênticas (KEEFER, 2004).

Um fator importante a ser considerado para geração de mamíferos transgênicos é a boa escolha da espécie a ser utilizada. Diversas espécies, tais como bovinos, caprinos, ovinos, suínos e leporinos já foram utilizadas para produção de transgênicos (HAMMER et al., 1985; KRIMPENFORT et al., 1991; EBERT et al., 1991). Houdebine (2009) compara o tempo requerido para obtenção de proteína exógena especificamente no leite de algumas das espécies de mamíferos biorreatores (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação do tempo requerido para obter proteínas recombinantes em diferentes espécies de mamíferos transgênicos

	Coelha	Porca	Ovelha	Cabra	Vaca
Tempo de gestação (meses)	1	4	5	5	9
Idade à maturidade sexual (meses)	5	6	8	8	15
Tempo entre transferência gênica e primeira lactação (meses)	7	16	18	18	33
Número de crias	8	10	1-2	1-2	1
Produção leiteira anual (litros)	15	300	500	800	8000
Proteína recombinante por fêmea por ano (kg)	0,02	1,5	2,5	4	40

FONTE: HOUEBINE, 2009.

2.1.2.1 Alternativas para a produção de ruminantes transgênicos

Devido a algumas desvantagens, principalmente a baixa eficiência e a incidência frequente de mosaicismo, têm-se investigado outras metodologias para melhorar a eficiência da produção de animais transgênicos (KUES; NIEMANN, 2004).

Atualmente, a geração desses animais pode ser realizada por diversas técnicas e estratégias além da microinjeção pró-nuclear e TNCS. Pode-se citar, por exemplo, a microinjeção intracitoplasmática de DNA (VICHERA et al., 2011); a incubação de espermatozoides com DNA, seguida de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI; LAVITRANO et al., 1989) ou fecundação *in vitro* (CAMPOS et al., 2011); o uso de lentivírus (JAENISCH, 1976); entre outras (Figura 1; adaptada de HOUEBINE, 2009).

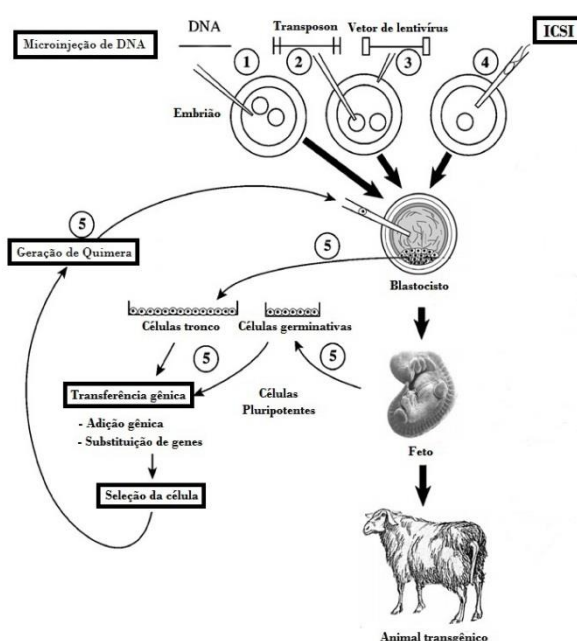


Figura 1. Diferentes métodos para produzir animais transgênicos. (1) Transfecção gênica por meio de microinjeção intracitoplasmática em embriões; (2) Transfecção de DNA por meio de um elemento de transposição, ou *transposon*: o elemento de transposição, que contém o gene de interesse, é microinjetado no pró-núcleo; (3) Transfecção gênica por meio de vetor lentiviral: o vetor lentiviral, que contém o gene de interesse, é injetado entre a zona pelúcida e a membrana do oócito ou embrião; (4) Transfecção gênica por meio de espermatozoide: o espermatozoide é incubado com o gene exógeno e microinjetado no citoplasma do oócito para fecundação por ICSI; (5) Transfecção gênica por meio de células pluripotentes: DNA é introduzido em linhagens de células pluripotentes. As células pluripotentes contendo DNA são injetadas em embriões para gerar animais quiméricos abrigando o gene exógeno em apenas algumas células (adaptada de HOUEBINE, 2009).

Além disso, diferentes moléculas, tais como lipossomos (CARBALLADA; DEGEFA; ESPONDA, 2000), nanopolímeros (CAMPOS et al., 2011) ou vesículas citoplasmáticas (PEREYRA-BONNET et al., 2011), podem ser usadas para transfecção de gametas e embriões. Nesse contexto, os peptídeos de penetração celular (PPCs) são moléculas peculiares que também podem ser utilizadas para a transfecção gênica.

2.2 PEPTÍDEOS DE PENETRAÇÃO CELULAR (PPCs)

2.2.1 Principais PPCs

Os PPCs são moléculas com pequenas sequências catiônicas que possuem alta afinidade por membranas lipídicas e apresentam a habilidade em penetrar células eucarióticas através de um mecanismo sem gasto de energia (POON; GARIÉPY, 2007; NASCIMENTO et al., 2007).

Diante disso, os PPCs vêm sendo utilizados como carreadores de agentes terapêuticos e moléculas de importância biológica para o interior de células (TORCHILIN, 2006). Dentre as moléculas que podem ser utilizadas para a transferência gênica em células e embriões de mamíferos, os peptídeos de penetração celular (PPCs) vêm ganhando destaque.

Inicialmente, Frankel e Pabo (1988) observaram a capacidade penetrante da proteína transativadora do vírus da imunodeficiência humana-1 (TAT HIV-1). Essa proteína viral tem a capacidade de ser internalizados pelas células quando está presente no meio. Em estudo posterior foi observada a atuação de sulfatos de heparan (SH) como receptores para absorção de TAT extracelular (TYAGI et al, 2001). Assim, foi visto que esta propriedade pode ser explorada para o direcionamento celular de proteínas.

Estudando o peptídeo *Antennapedia* (pAntp) de *Drosophila* foi observada a penetração dessa molécula nas células. Análises de neurônios por microscopia demonstraram que pAntp foi captado em todas as regiões das células nervosas e acumulou-se no núcleo (JOLIOT et al., 1991). Desde então, diversos outros peptídeos têm sido observados, como, por exemplo, VP22 (ELLIOTT; O'HARE, 1997), transportan (POOGA et al., 1998) e peptídeo de modelo anfipático (OEHLKE et al., 1998).

Essas moléculas vêm sendo usados para endereçar diversos tipos de substâncias, incluindo moléculas de peso molecular várias vezes superior e se destacam por apresentar capacidade penetrante por uma via aparentemente independente de energia. Além disso, a utilização de PPCs para o direcionamento de moléculas é eficaz para uma gama de tipos celulares, pode ser aplicado a grande quantidade de células e tem potenciais aplicações terapêuticas e biotecnológicas (LINDGREN et al., 2000).

Os PPCs podem ser divididos em subgrupos definidos pela sua origem ou sequências características. Essa divisão depende principalmente das sequências de

aminoácidos. Uma primeira classe seria composta por peptídeos formados por aminoácidos carregados positivamente em pH fisiológico (principalmente arginina e lisina) e capazes de interagir eletrostaticamente com glicoproteínas da superfície celular carregados negativamente (antes da internalização). A segunda classe abrange PPCs com elevado grau de anfipaticidade, nos quais a carga origina-se principalmente a partir de resíduos de lisina. Na terceira classe, os resíduos com carga e os resíduos hidrofóbicos são bastante separados na cadeia peptídica (KOREN; TORCHILIN, 2012).

Diante do exposto, torna-se evidente que os PPCs possuem uma ampla variedade de funções que podem ser aplicadas para o melhoramento de inúmeras biotecnologias, possuindo grande relevância para diversas áreas do conhecimento, como a terapia gênica, engenharia genética e suas diversas aplicações.

2.2.2 Crotamina

A crotamina foi primeiro observada no veneno da cascavel da América do Sul (*Crotalus durissus terrificus*) por Gonçalves e Polson (1947). Essa molécula se caracteriza por ter característica penetrante em células eucarióticas, sendo inclusa na classe dos PPCs (OGUIURA; BONI-MITAKE; RÁDIS-BAPTISTA, 2005). Nesse contexto, a crotamina vem sendo estudada por apresentar inúmeras aplicações biológicas já comprovadas.

A crotamina é formada por 42 aminoácidos, tendo um peso molecular de 4900 Da e contendo 9 lisinas, 2 argininas, 2 histidinas e 2 triptofanos e 6 resíduos de cisteína, envolvidos em três pontes dissulfeto (LAURE, 1975, RÁDIS-BAPTISTA et al., 1999). Estas características permitem que ela dobre em uma estrutura compacta formando uma curta α -hélice N-terminal e duas folhas- β anti-paralelas estabilizadas pelas pontes dissulfeto (NICASTRO et al., 2003; FADEL et al., 2005). A carga positiva, o pequeno tamanho da molécula e a capacidade de translocação nuclear são as principais características que qualificam a crotamina como um sistema de entrega (OGUIURA; BONI-MITAKE; RÁDIS-BAPTISTA, 2005).

A crotamina induz a contração do músculo esquelético de mamíferos *in situ* e *in vitro*. Por isso, a crotamina foi caracterizada como um peptídeo atuante nos canais de Na^+ , sendo a despolarização induzida por essa molécula a causa da contração (CHANG; TSENG; 1978; MATAVEL et al., 1998). Contudo, posteriormente, foi comprovado que a

os canais de Na^+ não são o alvo primário da crotamina (RIZZI et al., 2007), e que os efeitos provocados por ela está associado à inibição dos canais de K^+ (PEIGNEUR et al., 2012).

Esse peptídeo possui uma ampla versatilidade biológica e, por isso, o interesse clínico e biotecnológico dessa molécula aumenta cada vez mais. A crotamina não apresenta apenas atividade de penetração celular, mas também especificidade por células em proliferação, o que vem tornando essa molécula mais importante no diagnóstico e terapêutica antitumoral.

Além disso, a formação de um complexo com DNA não altera a especificidade *in vivo* da crotamina (NASCIMENTO et al., 2007), mostrando que a crotamina pode ser utilizada como agente terapêutico devido a seu efeito citotóxico *in vivo* quanto também a possibilidade de complexação da crotamina com outras moléculas de interesse terapêutico (NASCIMENTO et al., 2012).

2.2.2.1 Agente de penetração celular

A notável atividade biológica da crotamina como agente de penetração celular foi primeiramente descrita por Kerkis e colaboradores (2004). Nesse estudo, crotamina ligada a um marcador fluorescente (Cy3) foi incubada com células-tronco embrionárias, embriões e outros tipos de células murinas *in vitro* e *in vivo*. Assim, os autores relatam que baixas concentrações de crotamina (entre 0,1 μM e 10 μM) são capazes de penetrar diferentes tipos celulares, sem apresentar citotoxicidade.

Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que crotamina 1 μM não apresenta embriotoxicidade, tendo em vista que o número de mórulas que se desenvolveram em blastocistos foi similar para o grupo tratado (com crotamina) e controle (sem crotamina). Ainda foi verificado que essa molécula possui um direcionamento para a massa celular interna dos blastocistos obtidos (Figura 2).

Desta forma, foi constatado que a crotamina foi capaz de penetrar embriões murinos íntegros, ou seja, na presença da zona pelúcida embrionária. Esse fato deixa como perspectiva a utilização da crotamina como um agente de penetração em embriões de outras espécies de mamíferos.

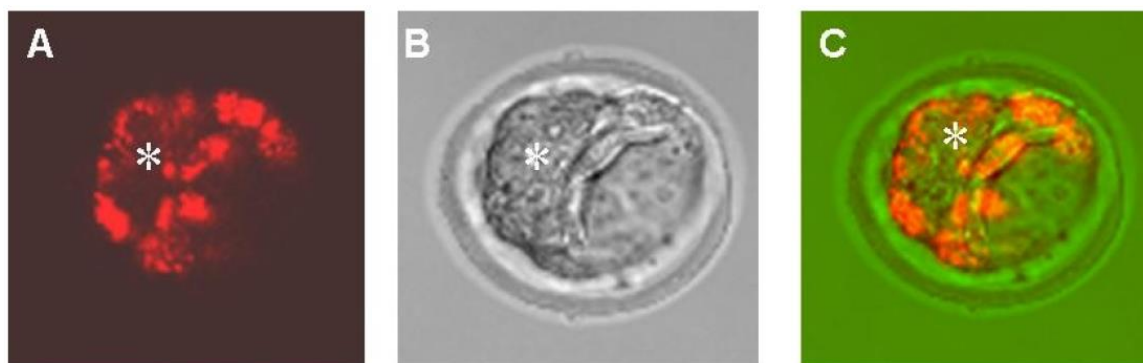


Figura 2. Absorção *in vitro* de crotamina-Cy3 em blastocisto em desenvolvimento. (A–C). Sinal fluorescente forte observado no interior da massa celular interna do blastocisto (asterisco). (A) = microscopia confocal de fluorescência (MCF); (B) = contraste de interferência digital (CID); (C) = sobreposição de MCF + CID; ampliação 250× (KERKIS et al., 2004).

2.2.2.2 Mecanismo de internalização

O mecanismo de internalização da crotamina envolve a absorção desse peptídeo por meio da interação com PGSH presentes na superfície celular. Em seguida, ocorre a endocitose e acúmulo da crotamina dentro de vesículas endossomais/lisossomos (NASCIMENTO et al, 2007). A permeabilização das membranas endossômicas, induzida pela própria crotamina, resulta no extravasamento do conteúdo vesical no citoplasma e direcionamento para o núcleo da célula.

Em geral, a citotoxicidade da crotamina se dá devido à correlação dessa cinética e da concentração de crotamina acumulada nas vesículas. As células internalizam crotamina em 5 min após a adição da molécula no meio. A internalização dessa molécula e extravasamento no citoplasma parece desencadear um processo de morte celular programada. Esse mecanismo parece estar relacionado a alterações no potencial de membrana celular e ativação da cascata metabólica das caspases (HAYASHI et al., 2008).

Após extravasamento no citosol, a crotamina se direciona para o núcleo da célula, sendo observada a localização nuclear da crotamina, ligando-se a centrossomos e cromossomos, nas fases S/G2 e G2/M do ciclo celular (KERKIS et al., 2004). Tal dinâmica de penetração da crotamina está esquematizada na figura 3.

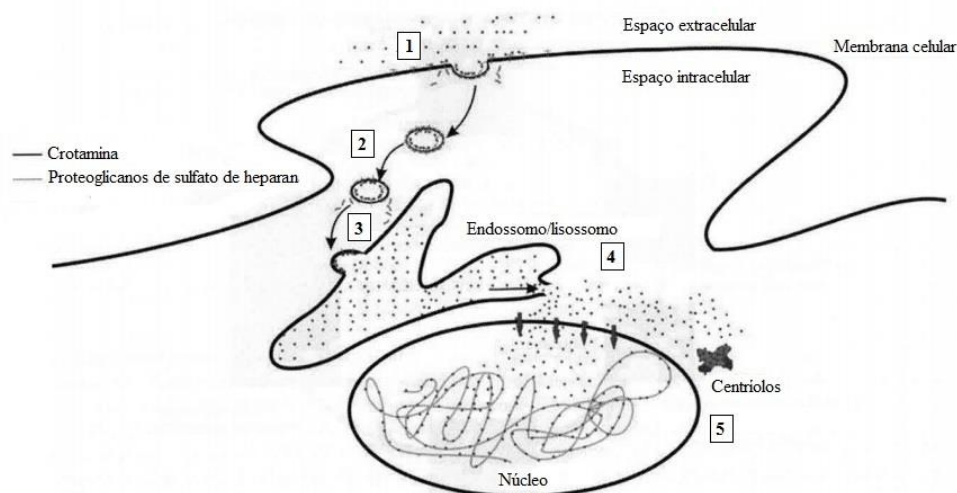


Figura 3. Mecanismo de penetração celular da crotamina. Uma vez que a crotamina esteja presente na matriz extracelular (1) ela (positivamente carregada) interage eletrostaticamente com os PGSH da membrana plasmática (negativamente carregados), (2) complexo de crotamina e PGSH são endocitados em vesículas, que são transportadas dentro do citoplasma, (3) essas vesículas se fundem aos endossomos/lisossomo, (4) a crotamina se acumula dentro do lisossomo até ser liberada no citosol. Uma vez que a crotamina esteja presente no citosol, ela interage com os centríolos e adentra o núcleo (5), interagindo com os cromossomos (KERKIS et al., 2010).

2.2.2.3 Agente de transfecção

A formação de complexo de crotamina com moléculas de DNA foi evidenciada por Nascimento e colaboradores (2007). Os autores relataram a formação do complexo crotamina-pEGFP-N1 em diferentes proporções de massa entre crotamina e DNA, não havendo diferença na transfecção quando utilizadas as proporções 1:2,5 ou 1:5 (m:m).

Em adição foi evidenciada a capacidade de transferência gênica em células-tronco embrionárias murinas e células HCT116 de carcinoma humano *in vitro* e também em diversos tecidos de camundongos *in vivo*. A partir disso, a aplicação da crotamina para a transfecção de células animais apresentou-se viável. Tal característica somada à capacidade de penetração embrionária da crotamina deixa como perspectiva a aplicação da crotamina em transgênese, especialmente para a produção de mamíferos transgênicos.

2.3 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

A produção *in vitro* de embriões é uma importante ferramenta para o entendimento do desenvolvimento inicial de embriões de mamíferos, bem como o entendimento de falhas reprodutivas, a propagação e/ou preservação dos gametas de animais de alto valor genético, entre outros (RIZOS et al., 2008). Além disso, a produção *in vitro* está intimamente ligada a transgênese para a geração, propagação e preservação do material genético de mamíferos transgênicos.

O procedimento para a produção *in vitro* envolve a maturação, a fecundação e o cultivo *in vitro*. Em cada um desses processos, é necessário submeter os oócitos, espermatozoides e embriões a ambientes específicos para o seu desenvolvimento. Diversos fatores podem influenciar a produção de blastocistos. Dentre eles podemos citar a qualidade oocitária, visto que ela é crucial para o desenvolvimento dos oócitos imaturos até blastocistos, e o ambiente de cultivo, pois esse pode influenciar a capacidade dos oócitos em formarem blastocistos (RIZOS et al., 2002).

Apesar das extensas pesquisas e diversidade de metodologias praticadas, a eficiência da técnica gira em torno de 80% de embriões clivados após 24 h a 48 h de fecundação e apenas 30-40% chegam ao estágio de blastocisto após 7 ou 8 dias de cultivo. A principal redução do desenvolvimento *in vitro* ocorre entre o estágio de duas células e a formação do blastocisto, sugerindo que o cultivo após a fecundação é o período mais crítico para a redução da eficiência do processo, em termos de taxa de produção de blastocistos (LONERGAN et al., 2006).

Na maioria das espécies, a avaliação da morfologia embrionária ainda é o método de escolha para a seleção de embriões para avaliação da qualidade embrionária e posterior transferência para receptoras. Contudo, com o aumento dos estudos realizados com embriões produzidos *in vitro* tem-se visto que a competência embrionária pode estar afetada apesar da ausência de alterações morfológicas.

Desta forma, utilizar apenas características morfológicas para prever a viabilidade *in vivo*, i.e., o potencial de implantação do embrião, pode não ser suficientemente acurado (OVERSTORM, 1996; DONNAY; PARTRIDGE; LEESE, 1999). Assim, outros métodos, como a análise ultraestrutural, criotolerância e avaliação da expressão gênica embrionária podem ser propostos.

2.3.1 Expressão gênica no embrião bovino

No embrião bovino, a expressão bem ajustada de genes derivados do genoma maternal ou embrionário regulam as mudanças ocorridas durante o desenvolvimento *in vitro*. A ativação do genoma embrionário ocorre no estágio de 8 a 16 células, contudo uma ativação menor do genoma embrionário pode ocorrer em embriões de até duas células (TELFORD; WATSON; SCHULTZ, 1990; MEMILI; FIRST, 2000).

Os genes relacionados à transcrição e tradução, modificações pós-traducionais de proteínas, regulação do ciclo celular, foliculogênese, estresse oxidativo, composição de histonas, adesão celular, síntese de prostaglandina, fatores de crescimento e sinalização celular, degradação de componentes da matriz extracelular e metabolismo estão associados à competência de desenvolvimento (WRENZYCKI et al., 2005).

Ao momento da compactação e posterior cavitação, o embrião sofre uma brusca mudança no padrão de utilização do substrato energético, substituindo o piruvato e o lactato pela glicose como substrato preferencial (RIEGER et al., 1992). O transporte dessa substância é regulado por transportadores de glicose. Foi relatado o aumento da abundância relativa de transcritos para esses transportadores (GLUT3 e GLUT4) em embriões produzidos *in vitro* quando comparados com embriões produzidos *in vivo* (LAZZARI et al., 2002).

Outro estudo demonstrou não haver diferença entre transcritos expressos em blastocistos expandidos aos dias 7 ou 8 de cultivo, sem que fosse detectada diferença na expressão gênica. Além do caráter temporal, foi analisada a expressão espacial dos transcritos, sendo demonstrados diferentes padrões de distribuição. Os transcritos para Plako e IF τ foram expressos apenas no trofotoderma (TE), enquanto Na/K, E-cad, ZO-1 e GLUT3 não tiveram diferença de expressão entre TE e massa celular interna (MCI), mas Dc II, GLUT1 e GLUT4 mostraram maior nível de expressão no TE em comparação com a MCI (WRENZYCKI; HERRMANN; NIEMANN, 2003).

Machado e colaboradores (2011) também detectaram diferenças entre os níveis de expressão de transcritos em embriões cultivados por até 15 dias em diferentes sistemas. A expressão de oito genes foi avaliada (PLAC8, G6PD, GLUT1, GLUT3, HSF1, IFNT, KRT8 e PGK1), mas apenas GLUT1 apresentou diferença dos níveis de expressão entre os grupos. Essa diferença pode estar associada ao papel desempenhado por esse transportador de soluto no metabolismo embrionário, no qual GLUT1 tem pouca função no transporte

apical de glicose, para dentro do embrião, mas apresenta papel no transporte de glicose intercelular (AUGUSTIN et al., 2001).

Outros genes importantes para o desenvolvimento embrionário estão associados à formação da blastocele e regulação do balanço osmótico embrionário. ATP1A1 é uma subunidade da proteína Na/K ATPase que promove um gradiente de íons através do trofotoderma que leva a um influxo de água para a blastocele (WATSON et al., 1999). Já a proteína AQP3 aumenta a permeabilidade celular a água e outros solutos pequenos, tais como glicerol, uréia, purinas e pirimidinas, sendo, desta forma, considerada pertencente a família das “aquagliceroporinas” (BARCROFT et al., 2003). Em estudo recente o efeito da vitrificação sobre a expressão de ATP1A1 e AQP3 foi avaliado, no qual não foi vista diferença na expressão do gene ATP1A1, mas inferior expressão de AQP3 foi encontrada em embriões vitrificados-aquecidos (CAMARGO et al., 2011).

3 JUSTIFICATIVA

A crotamina é uma toxina presente no veneno de serpentes com diversas características interessantes que a tornam uma molécula com aplicações biotecnológicas promissoras. Essa molécula não apresenta apenas atividade de penetração celular, mas também especificidade por células em proliferação, o que a vem tornando cada vez mais importante dentre os PPCs.

Além disso, estudos mostram seu papel como molécula carreadora de DNA exógeno para o interior de células, além da capacidade de formação de um complexo com plasmídeo. A formação de complexo com DNA não altera a especificidade *in vitro* da crotamina. Então, a investigação deste potencial é necessária, pois esse peptídeo pode vir a ser utilizado para a produção de mamíferos transgênicos, como um método alternativo ou molécula a ser utilizada conjuntamente aos métodos tradicionais. Neste contexto, a crotamina poderá contribuir com o aumento da eficiência da transgênese em ruminantes. Espera-se que, futuramente, a crotamina possa ser utilizada como biomolécula dentro de um programa de transgênese animal.

Para que isso possa ser alcançado, inicialmente, a toxicidade da crotamina em embriões bovinos produzidos *in vitro* necessita ser avaliada, para determinar as condições de incubação, quanto a faixa de concentração de crotamina e o tempo de incubação. Desta forma, o desenvolvimento *in vitro* de embriões incubados com crotamina deve ser monitorado.

Contudo, apesar de a avaliação da morfologia embrionária ainda ser o método de escolha para a avaliação do embrião, utilizar apenas características morfológicas pode não predizer acuradamente a competência embrionária. Assim, outros métodos para a avaliação da qualidade embrionária são necessários, tais como a avaliação da abundância relativa de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário por RT-PCR em tempo real.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

A crotamina não apresenta toxicidade em embriões bovinos incubados com essa molécula por até 24 h em uma faixa de concentração de 0,1 a 10 μ M.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a toxicidade da crotamina em embriões bovinos íntegros e recém-fecundados.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de desenvolvimento de embriões bovinos submetidos à incubação com crotamina por diferentes tempos;
- Analisar a capacidade de desenvolvimento de embriões bovinos submetidos à incubação com concentrações crescentes de crotamina;
- Comparar a expressão gênica de blastocistos bovinos em diferentes condições de incubação com crotamina.

The effect of crotamine, a cell-penetrating peptide from rattlesnake venom, on development and gene expression of *in vitro* produced bovine embryos

Iana S. Campelo^A, Alexsandra F. Pereira^A, Agostinho S. Alcântara-Neto^A, Luciana M. Melo^A, Gandhi Rádis-Baptista^B and Vicente J. F. Freitas^{AC}

^A Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, School of Veterinary Medicine, Ceará State University, Av. Dedé Brasil 1700, Fortaleza, 60714-903, Brazil

^B Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Institute of Marine Science, Ceará Federal University, Av. da Abolição 3207, Fortaleza, 60165-081, Brazil

^C Corresponding author: Vicente José de Figueirêdo Freitas
Universidade Estadual do Ceará/Faculdade de Veterinária
Av. Dedé Brasil, 1700 – Fortaleza-CE, Brazil 60714-903
Fax: +55 85 31019840
Phone: +55 85 31019861
E-mail: vicente.freitas@uece.br

Abridged title: Effect of crotamine on IVP bovine embryos

Abstract. The present study was conducted to investigate the effects of crotonamine, in different incubation times and concentrations, on both developmental competence and gene expression (*ATP1A1*, *AQP3*, *GLUT1* and *GLUT3*) of *in vitro* produced bovine embryos. Two experiments were performed: a) in the Experiment 1, 0.1 μ M crotonamine was tested during 6, 12 and 24 h of incubation, using two control groups (vehicle and *in vitro* fertilisation); b) in the Experiment 2, presumptive zygotes were incubated with 0 (vehicle), 0.1, 1 and 10 μ M crotonamine for 24 h. In the Experiment 1 no difference ($P > 0.05$) was observed among groups for blastocyst production rates and number of blastomeres per embryo. Also, within each incubation time, mRNA levels were similar ($P > 0.05$) in embryos cultured with or without crotonamine. Concerning the Experiment 2, concentrations as high as 10 μ M crotonamine did not affect ($P > 0.05$) the blastocyst rates. The use of 0.1 and 10 μ M crotonamine concentrations did not alter mRNA levels when compared to control ($P > 0.05$). Remarkably, only at the concentration of 1 μ M, crotonamine decreased both *ATP1A1* and *AQP3* expressions relative to control group ($P < 0.05$).

Additional keywords: cattle, embryo toxicity, developmental competence.

Introduction

The discovery of genetic code about 50 years ago suggested that gene isolation and transfer into living organisms would become major tools for biologists. The first gene transfer into mouse revealed the possibility of creating animals stably harbouring foreign DNA and having modified phenotypic properties was possible (Gordon *et al.* 1980; Palmiter *et al.* 1982).

Pronuclear DNA injection was also used to produce the first transgenic livestock (Hammer *et al.* 1985). Despite the inherent inefficiency of microinjection technology, several genetically modified large animals have been generated for applications in agriculture and biomedicine.

Several alternatives to pronuclear DNA injection have been developed to improve the efficiency and to reduce the cost of generating transgenic livestock (review in Kues and Niemann 2011). To date, somatic cell nuclear transfer (SCNT) holds the greatest promise for significant improvements in the generation of transgenic cattle. However, this method also has proved to be too costly and inefficient (Rideout *et al.* 2001).

Thus, for further growth of transgenic technology in large animals, it would be interesting to develop simple, inexpensive and efficient methods. The use of cell-penetrating peptides (CPPs) constitutes a promising alternative. CPPs are molecules that display the ability to internalize into eukaryotic cells through an energy-independent mechanism and to efficiently carry biologically active and therapeutically relevant molecules into the cells (Schwarze and Dowdy 2000). CPPs are represented by multiple sequences of short and positively charged peptides rich in arginine and lysine residues that penetrate through usually impermeable cellular membranes and accumulate in the cytoplasm and/or in the nucleus of the cells (Gupta *et al.* 2005).

Kerkis *et al.* (2004) described that crotamine, a myotoxin isolated from the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), is a CPP presenting both cytoplasmic and nuclear localization. Crotamine in the micromolar range penetrates into cells during G₁/S period, binding to centrosomes and chromosomes. On the other hand, studies have assessed the possible toxic effects of crotamine on some cell types (Nascimento *et al.* 2007; Hayashi *et al.* 2008; Nascimento *et al.* 2012). Only a single study in mouse describes the crotamine is able to penetrate intact embryos (Kerkis *et al.* 2004). The authors describe the absence of embryo toxicity after incubation at 1 μ M crotamine concentration.

However, until now any detailed studies were conducted that evaluate the effects of

crotamine on the progression and quality of cattle embryo. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effects of embryo exposure to crotamine, in different incubation times and concentrations, as well as the effect of crotamine on the quality of *in vitro* produced bovine embryos. Such effects were evaluated with respect to both developmental competence and gene expression of selected molecular markers.

Material and methods

Ethics

This study was approved by the Ethics Committee for Animal Use of the Ceará State University (No. 12641799-7) and is in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by this committee.

Reagents

Unless indicated otherwise, all chemicals were obtained from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA).

Obtention of crotamine

Crotamine was previously purified from the crude venom of rattlesnake venom, which was kept in the serpentarium of the São Paulo University (Ribeirão Preto, Brazil). The method for crotamine isolation it was described previously by Kerkis *et al.* (2004). Briefly, the venom was diluted with ammonium formate buffer and the bulk of crotoxin, the major venom component, was eliminated by slow-speed centrifugation. Tris-base was added and the solution was applied to a CM-Sepharose FF column (1.5×4.5 cm; Amersham-Biosciences, Buckinghamshire, UK). After, the column was washed and crotamine was recovered, dialyzed and lyophilized, and stored at room temperature until use.

Experimental design

Two experiments were conducted to verify the development and gene expression in embryos incubated with crotamine. In the Experiment 1, it was tested different times of incubation (6, 12 and 24 h) of presumptive zygotes with 0.1 μ M crotamine. This concentration was chosen according previous studies (Nascimento *et al.* 2007). In this experiment, two control groups were used: vehicle (without crotamine for each incubation

time) and traditional *in vitro* fertilisation (IVF). In the Experiment 2, different concentrations of crotonamine (0.1, 1 and 10 μM) were incubated with presumptive zygotes for 24 h. In this experiment, it was used a control group without crotonamine (vehicle).

Oocyte collection, in vitro production (IVP) of embryos

The ovaries of adult cows were collected from a local slaughterhouse and were transported to the laboratory in 0.9% (w/v) NaCl solution containing antibiotics (Pentabiotico, Fort Dodge, Campinas, Brazil). *Cumulus*-oocyte complexes (COCs) from follicles 2-8 mm in diameter were aspirated by using a 21-gauge needle attached to a 10-mL disposable syringe. Only COCs of equal size with evenly granulated ooplasm surrounded by multiple layers of compact *cumulus* cells were selected in all experiments. After collection, the COCs were washed twice with Hepes-Tyrodé's lactate-pyruvate-albumine (TALP-H; Bavister and Yanagimachi 1977). Groups up to 50 COCs were placed in 500- μL of maturation medium containing bicarbonate-buffered Medium 199 supplemented with 10% (v/v) foetal calf serum (FCS, Gibco, Carlsbad, CA, USA), 0.2 mM sodium pyruvate, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamycin, 10 ng mL^{-1} epidermal growth factor (EGF), 100 μM cysteamine, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FSH/LH (Pluset, Calier, Spain) and 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 17 β -oestradiol. The *in vitro* maturation (IVM) was performed at 38.5°C for 24 h in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . Matured COC were placed in Petri dishes containing 100 μL of Fert-TALP medium (Gordon 1994) supplemented with 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ heparin (Calbiochem, San Diego, CA, USA) and 6 mg mL^{-1} fatty acid-free bovine serum albumin-BSA. The IVF was performed with frozen-thawed and Percoll-separated semen (final concentration of 15×10^6 spermatozoa per mL) covered with mineral oil (Irvine Scientific, Irvine, CA, USA) at 38.5°C under an atmosphere of 5% CO_2 in air with maximum humidity. Approximately 6 h post insemination (hpi), presumptive zygotes were denuded by repeated pipetting in TALP-H for subsequent incubation with crotonamine in different times and concentrations.

In vitro embryo development

In the Experiments 1 and 2, presumptive zygotes were cultured in modified CR2aa medium (Rosenkrans and First 1994) supplemented with 1 mg mL^{-1} fatty acid-free BSA and 2.5% FCS. The culture was performed in 100 μL drops under mineral oil at 5% CO_2 and 38.5°C in high humidity for 192 hpi. Cleavage was assessed at 72 hpi and blastocyst at 168 (day 7) and 192 (day 8) hpi. At day 8 of culture, embryos were stained in Hoechst

33342 (Pursel *et al.* 1985) and mounted between coverslips to count the nuclei number under an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E400, Tokyo, Japan).

RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was prepared in quadruplicate from three pooled blastocysts (day 8 of culture) sampling groups using the RNeasy micro kit (Qiagen Sci., Germantown, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 75 μ L lysis buffer was added to each frozen sample and the lysate was diluted 1:1 with 70% ethanol and transferred to a spin column. Genomic DNA was degraded using RNase-free DNase for 15 min at room temperature. After three washes, the RNA was eluted with 10 μ L RNase-free water. The reverse transcription, was performed with 1 μ L of Improm II (Promega, Madison, WI, USA) in buffer, combined with 0.5 mM of each dNTP (Promega), 40 U of RNaseOUT (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), and RNase-free water to make a final reaction volume of 20 μ L. Reverse transcription was performed at 42°C for 60 min, followed by 70°C for 15 min. The first strand cDNA products were then stored at -80°C for later use as template for quantitative real-time PCR (qPCR). Negative controls or RT blanks were prepared under the same conditions, but without inclusion of reverse transcriptase.

Quantitative real-time PCR

The qPCR amplifications were performed in a Master-Cycler EP Realplex4 S (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The four cDNA replicates from each group were pooled prior to the PCR experiments, which were run in triplicates for target and reference genes (Table 1). Target genes were Na/K ATPase isoform 1 (*ATP1A1*), aquaporin 3 (*AQP3*), glucose transporter-1 (*GLUT1*) and glucose transporter-3 (*GLUT3*). Reference genes were glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and member Z of H2A histone family (*H2A*). Each reaction consisted of 20 μ L total volume containing 10 μ L 2 $\times$ Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0.3 μ M of each primer and 0.5 μ L cDNA (equivalent to 0.075 embryo). The qPCR protocol comprehended an initial incubation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of an amplification program of 95°C for 15 s, 55°C for 15 s and 60°C for 30 s. Fluorescence data was acquired during the 72°C extension steps. Threshold and quantification cycle (Cq) and melting temperature (Tm) values were automatically determined by Realplex 2.2 software (Eppendorf AG), using default parameters. To determine the linearity (R²) and the

efficiency (E) of the PCR amplifications, standard curves were generated for each gene using serial dilutions of a cDNA preparation from 20 (for *GAPDH*, *H2A* and *ATP1A1*) or 40 (for *AQP3*, *GLUT1* and *GLUT3*) hatched blastocysts, with all other conditions being identical. Specificity of each reaction was ascertained after completion of the amplification protocol. This was achieved by performing the melting procedure (55–95°C, starting fluorescence acquisition at 55°C and taking measurements at 10 s intervals until the temperature reached 95°C). As negative controls, samples with RNA but without reverse transcriptase were used.

Data analysis

The statistical analysis in cleavage and blastocyst rates was assessed by non-parametric Fisher's exact test, while the average number of blastomeres was compared using one-way ANOVA. The relative quantification of the expression of gene was performed using the 2- $\Delta\Delta C_t$ method (Livak and Schmittgen 2001). Target gene expression was normalized against geometric mean of *GAPDH* and *H2A* transcript levels (Vandesompele *et al.* 2002). The differences in relative abundance of specific transcripts were compared using the Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Dunn's test. The corresponding real-time PCR efficiencies were calculated from the given slopes (S) of the standard curves, according to the equation: $E = 10^{(-1/S)} - 1$. Linearity was expressed as the square of the Pearson correlation coefficient (R^2). T_m data were expressed as mean $\pm$ SD of three or more measurements. For all analysis, P values less than 0.05 were considered to be statistically significant using Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Embryo development

The present work accessed the possible innocuous or cytotoxic effects of crotamine on the quality of IVP bovine embryos. Thus, we evaluated the developmental competence until the stage of blastocyst. In addition, the gene expression of selective molecular markers from embryos exposed to crotamine in comparison to controls were quantitatively analysed by qPCR.

In the Experiment 1, a total of 2,320 presumptive zygotes from ten replicates originated 1,281 cleaved embryos and a total of 740 blastocysts. The presence of 0.1 μ M crotamine in the culture medium, even so long as 24 h, did not affect the blastocyst production rate

(Table 2). Thus, the blastocyst rates at day 8 achieved after 6, 12 or 24 h of crodamine incubation were similar ($P > 0.05$) to the same period of time when with control exposed to vehicle (150 mM NaCl) and with the IVF group. Additionally, the embryo development appeared to be synchronised once both cleavage and blastocyst rate at day 7 were statistically equal ($P > 0.05$) between the groups with and without crodamine. Also, the hatching rates of the blastocysts at day 8 were similar ($P > 0.05$) between groups. Thus, the number of hatched embryos did not differ from IVF group in the presence or absence of crodamine for 6h, 12 h and 24 h (Table 2).

Still regarding the experiment 1, the time of exposure to 1 μ M crodamine did not affect the number of blastomeres per embryo even as compared to IVF group ($P > 0.05$). Thus, expanded blastocysts had cell counts (mean $\pm$ SD) of 127.7 ± 54.1 , 130.3 ± 37.6 and 132.7 ± 47.1 after 6, 12 and 24 h of crodamine incubation, respectively, and 116.9 ± 28.9 , 126.2 ± 32.9 and 133.4 ± 41.8 after 6, 12 and 24 h of vehicle incubation, respectively. While the IVF group produced expanded blastocysts with 116.3 ± 44.5 cells per embryo, in the same *in vitro* conditions. Likewise, hatched blastocysts achieved with or without crodamine have similar ($P > 0.05$) cell counts for 6h (175.4 ± 59.7 vs 220.8 ± 65.6), 12 h (151.0 ± 37.9 vs 179.5 ± 46.4) and 24 h (203.9 ± 92.2 vs 207.8 ± 71.2) treatments. In addition, all these cell counts were similar ($P > 0.05$) to the IVF group (210.8 ± 79.9).

After finding that the incubation with 150mM NaCl up to 24 h did not affect the bovine embryo development, when compared to IVF, the control group in the Experiment 2 was only constituted by the vehicle (0 μ M crodamine). In this assay, a total of 1,198 presumptive zygotes from ten replicates originated 642 cleaved embryos and a total of 312 blastocysts. Overall, concentrations as high as 10 μ M crodamine did not affect the blastocyst rates calculated at both day 7 and 8 (Table 3). In addition, the hatching rates measured at day 8 did not differ ($P > 0.05$) among distinct crodamine concentrations which were used for incubation.

Gene expression

Initially, to validate our qPCR conditions, standard curves prepared with serial dilutions of embryo cDNAs were plotted for all genes. These experiments give valuable information about the range of template concentrations that yields adequate amplification efficiencies to validate qPCR conditions. In our analyses, when using the cDNA from 0.00016 to 1 embryo per reaction (varying with the gene, Table 4), amplification reactions presented

high linearity ($R^2 \geq 0.98$) and efficiency near to 1 (E from 0.99 to 1.05). These results indicate that differentially expressed mRNA species can be analysed using our qPCR conditions, as long as the template concentrations (such as 0.075 embryo per reaction) fall within the linear range (Dussault and Pouliot 2006). Thus, qPCR amplifications were specific, once derivative melting curve of amplicons produced a single peak per gene. Finally, no amplification was observed for samples without reverse transcriptase enzyme (negative controls) in reaction tube.

In general, *ATP1A1*, *AQP3*, *GLUT1* and *GLUT3* transcripts were successfully detected in all bovine embryos independently of the incubation with crodamine in embryonic culture medium. In the Experiment 1, the presence of 0.1 μ M crodamine in the culture medium did not affect gene expression of bovine embryo even up to 24 h of incubation (Fig. 1). Thus, within each incubation time, mRNA levels were similar ($P > 0.05$) in embryos cultured with and without crodamine. Also, expression in each crodamine group did not significantly differ ($P > 0.05$) from IVF. As expected, incubation up to 24 h solely with vehicle (150 mM NaCl) did not change ($P > 0.05$) the levels of *ATP1A1*, *AQP3*, *GLUT1* or *GLUT3* transcripts in bovine embryos when compared to IVF group. In the Experiment 2 (Fig. 2), 0.1 and 10 μ M crodamine concentrations for 24 h incubation did not induce mRNA level changes when compared to control exposed to vehicle. Remarkably, only at the concentration of 1 μ M, crodamine decreased both *ATP1A1* and *AQP3* expressions relative to control group (vehicle). In contrast, with this crodamine concentration, *GLUT1* and *GLUT3* transcript levels were similar to vehicle ($P > 0.05$).

Discussion

In the present work, the potential effect of crodamine on the *in vitro* development of bovine embryos and the quantitative gene expression of selected embryonic markers were investigated. Immediately after fertilisation, presumptive zygotes were cultured in the presence of 0.1 to 10 μ M crodamine up to 24 h incubation. Overall, the crodamine did not impair any embryotoxic effects or disturb the embryo development at the tested conditions. The presence of 0.1 μ M crodamine in the culture medium even for 24 h neither affected the embryo production, as indicated by blastocyst rates measured at both day 7 and 8 after fertilisation, nor embryo quality, as indicated by blastomere counts. Also, this condition did not apparently affect the developmental kinetics, since cleavage and hatching rates

were similar between groups exposed or not to crodamine and IVF. It is possible that future applications of crodamine as CPP for animal transgenesis by embryo transfection may be limited to an incubation time not longer than 24 h once the crodamine cell uptake seems to be really fast, as indicated by studies with several mammalian cells. Thus, Kerkis *et al.* (2004) investigated the Cy3-crodamine uptake *in vitro* at 1 μ M concentration by human primary fibroblasts, lymphoblastic cells, murine embryonic stem and endothelial s-vec cells monitored by confocal microscopy after 5 min and 1, 3, 24, and 48 h treatment. Overall, the cells internalized crodamine as fast as 5 min after its addition and the number of labelled cells reached a maximum after about 3 h of treatment. Similar interval for cellular uptake of fluorescently labelled crodamine was reported for highly proliferative CHO-K1 cells (Hayashi *et al.* 2008). On the other hand, when using embryos, it is important to highlight that the barrier imposed by zona pellucida (ZP) could delay this time of internalisation. Thus, the crodamine uptake at 1 μ M concentration was evidenced by confocal microscopy in compact mouse morulae after 24 h incubation (Kerkis *et al.* 2004). In the present work we did not tested incubation times greater than 24 hours.

The ZP is a glycoproteinaceous translucent matrix that surrounds the mammalian oocyte and plays a critical role in the accomplishment of fertilisation (Gupta *et al.* 2012). Then, another relevant aspect is the ZP glycoproteic composition since crodamine-carbohydrate interaction has been extensively reported (review in R  dis-Baptista and Kerkis 2011). In fact, it is known that some CPPs interact electrostatically with the extracellular matrix of the cell then followed by endocytosis (Nascimento *et al.* 2007; Richard *et al.* 2003). More specifically, crodamine internalisation seems to be mediated by Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPGs) in the uptake phase (Nascimento *et al.* 2007). In the context of the present work, we did not confirm that N- and O-glycans of bovine embryo ZP could interact with crodamine in the culture medium. Therefore, it is premature to infer whether the zone itself could affect the number of crodamine molecules available for embryo uptake.

Therefore, beyond 0.1 μ M, we used 1 and 10 μ M crodamine in the culture medium also for 24 h contact with presumptive zygotes. The presence of crodamine concentration greater than 0.1 μ M, as indicated for results from Experiment 2, seems not affect the final production and quality of 8-day embryos. Nonetheless, at molecular level, produced embryos appear to be different from control. Thus, concerning qPCR analysis, the levels of both *ATP1A1* and *AQP3* transcripts detected in embryos incubated for 24 h with 1 μ M

crotamine were lower than control, but similar when treated with crotamine 10 μ M. On the other hand, alterations in mRNA levels in 8-day embryos were not detected for *GLUT1* and *GLUT3* in 1 μ M crotamine group. Additionally, embryos produced at all incubation times with 0.1 μ M crotamine had the same relative levels of all transcripts (*ATP1A1*, *AQP3*, *GLUT1* and *GLUT3*) like the control groups. The expression level of these genes has been correlated to embryo quality (Camargo *et al.* 2011; Kuzmany *et al.*, 2011) once the encoded proteins play important roles in the physiological process at preimplantation stage of embryo development (Rizos *et al.* 2008). The expression of *ATP1A1* and *AQP3* genes are reported to be involved on embryo osmotic regulation and blastocoele formation. *ATP1A1* is the protein of the Na/K ATPase subunit responsible to generate ionic gradient through trophectoderm and subsequent water influx to blastocoele (Watson *et al.* 1999). While the *AQP3*, an aquaglyceroporin, increases the cellular permeability to water and other small solutes, as glycerol, urea, purines and pyrimidines (Barcroft *et al.* 2003). The *GLUT* proteins are described to be engaged in energetic metabolism of the mammalian embryos (Purcell and Moley, 2009). *GLUT3* has been reported to play a central role on the glucose absorption, while *GLUT1* is responsible by the intracellular glucose transport (Augustin *et al.* 2001).

In this context, all bovine embryos produced along the present study seem to have normal development concerning energetic metabolism, as indicated by the expression levels of metabolic-related genes, as *GLUT1* and *GLUT3*. Only the embryos cultured in the presence of 1 μ M crotamine for 24 h decreased expression of osmotic-related genes (*ATP1A1* and *AQP3*) relative to the control. Crotamine concentrations lower and higher than 1 μ M did not change *ATP1A1* and *AQP3* levels. It is possible that crotamine concentration as low as 0.1 μ M is not able to switch on the osmotic response of bovine embryos. While higher concentrations, as 10 μ M crotamine, start up compensatory embryo response at transcriptional level faster than 1 μ M. This pattern of gene expression regulation on *in vitro* cultured cells was already been reported in response to the presence of some substances in the culture medium (Camargo *et al.* 2011). Nevertheless, these changes did not interfere with the IVP and the development of bovine embryos, as both blastocyst and hatching rates were similar among all groups.

In conclusion, crotamine application, as cell-penetrating peptide for bovine transgenesis and embryo transfection, is apparently viable from the standpoint of innocuousness and lack of detectable toxicity for whole embryos. Moreover, as demonstrated here, it is

possible to use crotonamine in the culture medium with concentration ranging from 0.1 to 1 μ M and incubation time up to 24 h. Further studies could address the feasibility of crotonamine as an effective carrier of DNA molecule for whole bovine embryos in animal transgenesis.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge to Dr. Eduardo Oliveira (São Paulo University, Ribeirão Preto, Brazil) for provide crotonamine. We are also thankful to Mr. Claudio Andrade (the inspection service of beef slaughterhouse, Morada Nova, Brazil) in supplying bovine ovaries. This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brazil) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP, Fortaleza, Brazil).

References

- Augustin, R., Pocar, P., Navarrete-Santos, A., Wrenzycki, C., Gandolfi, F., Niemann, H. and Fischer, B. (2001). Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **60**, 370–376.
- Barcroft, L. C., Offenberg, H., Thomsen, P., and Watson, A. J. (2003). Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. *Develop. Biol.* **256**, 342–354.
- Bavister, B., and Yanagimachi, R. (1977). The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* **16**, 228–237.
- Camargo, L. S., Boite, M. C., Wohlfres-Viana, S., Mota, G.B., Serapião, R. V., Sa, W.F., Viana, J.H., and Nogueira, L.A. (2011). Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. *Cryobiology* **63**, 256–262.
- Dussault, A. A., and Pouliot, M. (2006). Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol. Proc. Online* **8**, 1–10.

- 375 Gordon, I. (1994). 'Laboratory Production of Cattle Embryos.' (CAB International:
376 London).
- 377 Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J.A., and Ruddle, F.H. (1980).
378 Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl.*
379 *Acad. Sci. USA* **77**, 7380–7384.
- 380 Gupta, B., Levchenko, T. S., and Torchilin, V. P. (2005). Intracellular delivery of large
381 molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv. Drug Deliv.*
382 *Rev.* **57**, 637–651.
- 383 Gupta, S. K., Bhandari, B., Shrestha, A., Biswal, B. K., Palaniappan, C., Malhotra, S. S.,
384 and Gupta, N. (2012). Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function
385 during fertilization. *Cell Tissue Res.* **349**, 665–678.
- 386 Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad Jr., C. E., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M.,
387 Palmiter, R. D., and Brinster, R.L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs
388 by microinjection. *Nature* **315**, 680–683.
- 389 Hayashi, M. A., Nascimento, F. D., Kerkis, A., Oliveira, V., Oliveira, E. B., Pereira, A.,
390 Rádis-Baptista, G., Nader, H. B., Yamane, T., Kerkis, I., and Tersariol, I. L. (2008).
391 Cytotoxic effects of crotamine are mediated through lysosomal membrane
392 permeabilization. *Toxicon* **52**, 508–517.
- 393 Kerkis, A., Kerkis, I., Rádis-Baptista, G., Oliveira, E. B., Vianna-Morgante, A. M., Pereira,
394 L. V., and Yamane, T. (2004). Crotamine is a novel cell-penetrating protein from the
395 venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Faseb J.* **18**, 1407–1409.
- 396 Kues, W.A., Niemann, H. (2011). Advances in farm animal transgenesis. *Prev. Vet. Med.*
397 **102**, 146–156.
- 398 Kuzmany, A., Havlicek, V., Wrenzycki, C., Wilkening, S., Brem, G., and Besenfelder, U.
399 (2011). Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured
400 under different conditions. *Theriogenology* **75**, 482–494.
- 401 Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using
402 real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**, 402–408.
- 403 Nascimento, F. D., Hayashi, M. A., Kerkis, A., Oliveira, V., Oliveira, E. B., Rádis-
404 Baptista, G., Nader, H. B., Yamane, T., Tersariol, I. L. S., and Kerkis, I. (2007). Crotamine

- 405 mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. *J.*
406 *Biol. Chem.* **282**, 21349–21360.
- 407 Nascimento, F. D., Sancey, L., Pereira, A., Rome, C., Oliveira, V., Oliveira, E. B., Nader,
408 H. B., Yamane, T., Kerkis, I., Tersariol, I. L. S., Coll, J., and Hayashi, M. A. F. (2012).
409 The natural cell-penetrating peptide crotamine targets tumor tissue *in vivo* and triggers a
410 lethal calcium-dependent pathway in cultured cells. *Mol. Pharmaceutics* **9**, 211–221.
- 411 Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G.,
412 Birnberg, N. C., and Evans, R.M. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs
413 microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* **300**, 611–615.
- 414 Pursel, V. G., Wall, R. J., Rexroad, C. E., Jr, Hammer, R. E., and Brinster, R. L. (1985). A
415 rapid whole-mounted staining products for nuclei of mammalian eggs. *Theriogenology* **24**,
416 687–691.
- 417 Purcell SH, Moley KH. (2009). Glucose transporters in gametes and preimplantation
418 embryos. *Trends Endocrinol Metab.* **20**, 483-489.
- 419 Rádis-Baptista G, and Kerkis I. (2011). Crotamine, a small basic polypeptide myotoxin
420 from rattlesnake venom with cell-penetrating properties. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 4351 –43
421 61.
- 422 Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik,
423 L. V., and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism
424 of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* **278**, 585–590.
- 425 Rideout, W. M., Eggan, K., and Jaenisch, R. (2001). Nuclear cloning and epigenetic
426 reprogramming of the genome. *Science* **293**, 1093–1098.
- 427 Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., Fuente, J., Lonergan, P., and Gutiérrez-
428 Adán, A. (2008). Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and
429 quality. *Reprod. Dom. Anim.* **43**, 44–50.
- 430 Rosenkrans, C. F., Jr and First, N. L. (1994). Effect of free amino acids and vitamins on
431 cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *J. Anim. Sci.* **72**, 434–437.
- 432 Schwarze, S. R., and Dowdy, S. F. (2000). *In vivo* protein transduction: intracellular
433 delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**,
434 45–48.

- 435 Vandesompele, J., Preter, D. K., Pattynm F., Poppe, B., Roy, N. V., Paepe, A. D., and
436 Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by
437 geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen. Biol.* **3**, 1–12.
- 438 Watson, A. J., Westhusin, M. E., De Sousa, P. A., Betts, D. H., and Barcroft, L. C. (1999).
439 Gene expression regulating blastocyst formation. *Theriogenology* **51**, 117–133.
- 440

Tables

Table 1. Oligonucleotides used for qPCR analysis of gene expression in *in vitro* produced bovine embryos

F, forward primer; R, reverse primer

Gene	Primer sequence (5'-3')	GenBank accession number	Product size (bp)
<i>ATP1A1</i>	F: AACCGGCAGCTGTTTCAGAG R: TAAGCCTCGGCTCAAGTCTG'	NM_001076798	152
<i>AQP3</i>	F: TGAACCCTGCCGTGACATTT R: GGCCCAGATCGCATCGTAAT'	NM_001079794	143
<i>GLUT1</i>	F: CACTGGAGTCATCAACGCCC' R: CGGCCGAAACGGTTAACAAA	M60448	189
<i>GLUT3</i>	F: CATCAATGCTCCTGAGGCGA R: AGCCAATCATAACCACCCACG	NM_174603	143
<i>GAPDH</i>	F: TTCAACGGGCACAGTCAAGG R: ACATACTCAGCACCAGCATCAC	NM_001034034	119
<i>H2A</i>	F: TCCGGAAAGGCCAAGACAAA R: GTGTCGATGAATACGGCCCA	NM174809	81

449 **Table 2. Effect of incubation time with crotamine on development of *in vitro* produced bovine embryos**

450 Experiment was replicated ten times; different superscripts within the same column differ significantly ($P < 0.05$)

451

Incubation time (h)	Crotamine	Presumptive zygotes	Cleavage (%)	Blastocysts (%)		Hatching (%)
				Day 7	Day 8	
6	+	359	193 (53.8) ^a	104 (29.0) ^a	113 (31.5) ^a	54 (47.8) ^a
	-	305	169 (55.4) ^a	84 (27.5) ^a	98 (32.1) ^a	48 (49.0) ^a
12	+	297	166 (55.9) ^a	90 (30.3) ^a	101 (34.0) ^a	52 (51.5) ^a
	-	296	162 (54.7) ^a	79 (26.7) ^a	87 (29.4) ^a	41 (47.1) ^a
24	+	409	223 (54.5) ^a	115 (28.1) ^a	134 (32.8) ^a	61 (45.5) ^a
	-	296	165 (55.7) ^a	92 (31.1) ^a	92 (31.1) ^a	49 (53.3) ^a
IVF (control)		358	203 (56.7) ^a	102 (28.5) ^a	115 (32.1) ^a	59 (51.3) ^a

452

453

454 **Table 3. Effect of crotamine concentration on development of *in vitro* produced bovine embryos**

455 Experiment was replicated ten times; different superscripts within the same column differ significantly ($P < 0.05$)

456

Crotamine (μM)	Presumptive zygotes	Cleavage (%)	Blastocysts (%)		Hatching (%)
			Day 7	Day 8	
0	295	168 (57.0) ^a	70 (23.7) ^a	85 (28.8) ^a	37 (43.5) ^a
0.1	296	141 (47.6) ^b	69 (23.3) ^a	81 (27.4) ^a	38 (46.9) ^a
1	298	154 (51.7) ^{a,b}	56 (18.8) ^a	69 (23.1) ^a	31 (44.9) ^a
10	309	179 (57.9) ^a	65 (21.0) ^a	77 (24.9) ^a	31 (40.3) ^a

457

458

459

Table 4. Standard curve parameters for validation of qRT-PCR amplifications in bovine embryos

Standard curves were constructed for target (*ATP1A1*, *AQP3*, *GLUT1* and *GLUT3*) and reference (*GAPDH* and *H2A*) genes and the successfully amplified template ranges were presented. Derivative melting curves of target and reference gene amplicons produced the mean T_m values

Gene	Slope	Efficiency	R^2	Template range (number of embryos)	T_m (°C)
<i>ATP1A1</i>	-3.335	0.99	0.98	0.004 to 0.5	79.55 ± 0.20
<i>AQP3</i>	-3.319	1.00	0.98	0.00032 to 1	85.39 ± 0.24
<i>GLUT1</i>	-3.302	1.01	0.99	0.00032 to 1	86.43 ± 0.24
<i>GLUT3</i>	-3.213	1.05	1.00	0.008 to 1	84.09 ± 0.27
<i>GAPDH</i>	-3.276	1.02	0.98	0.00016 to 0.5	82.68 ± 0.26
<i>H2A</i>	-3.283	1.02	0.98	0.0008 to 0.5	83.87 ± 0.26

Figures

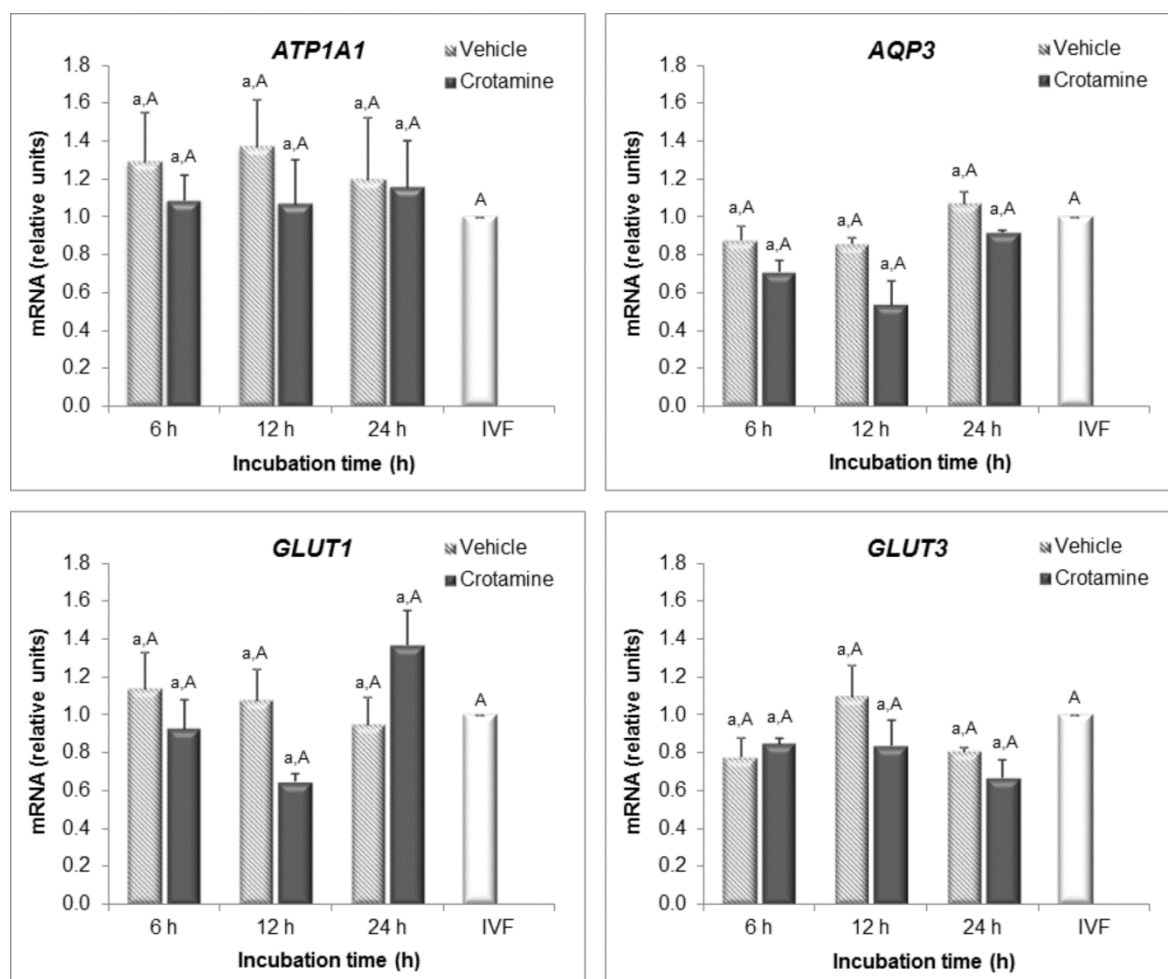


Fig. 1. Effect of crotonamine incubation time on gene expression of *in vitro* produced bovine embryos. Quantification of *ATP1A1*, *AQP3*, *GLUT1* and *GLUT3* transcripts were performed by qPCR using *GAPDH* and *H2A* as reference genes. The IVF group was used as calibrator. Comparisons were made between groups within each incubation time (a,b: $P < 0.05$) or for each group vs IVF (A,B: $P < 0.05$).

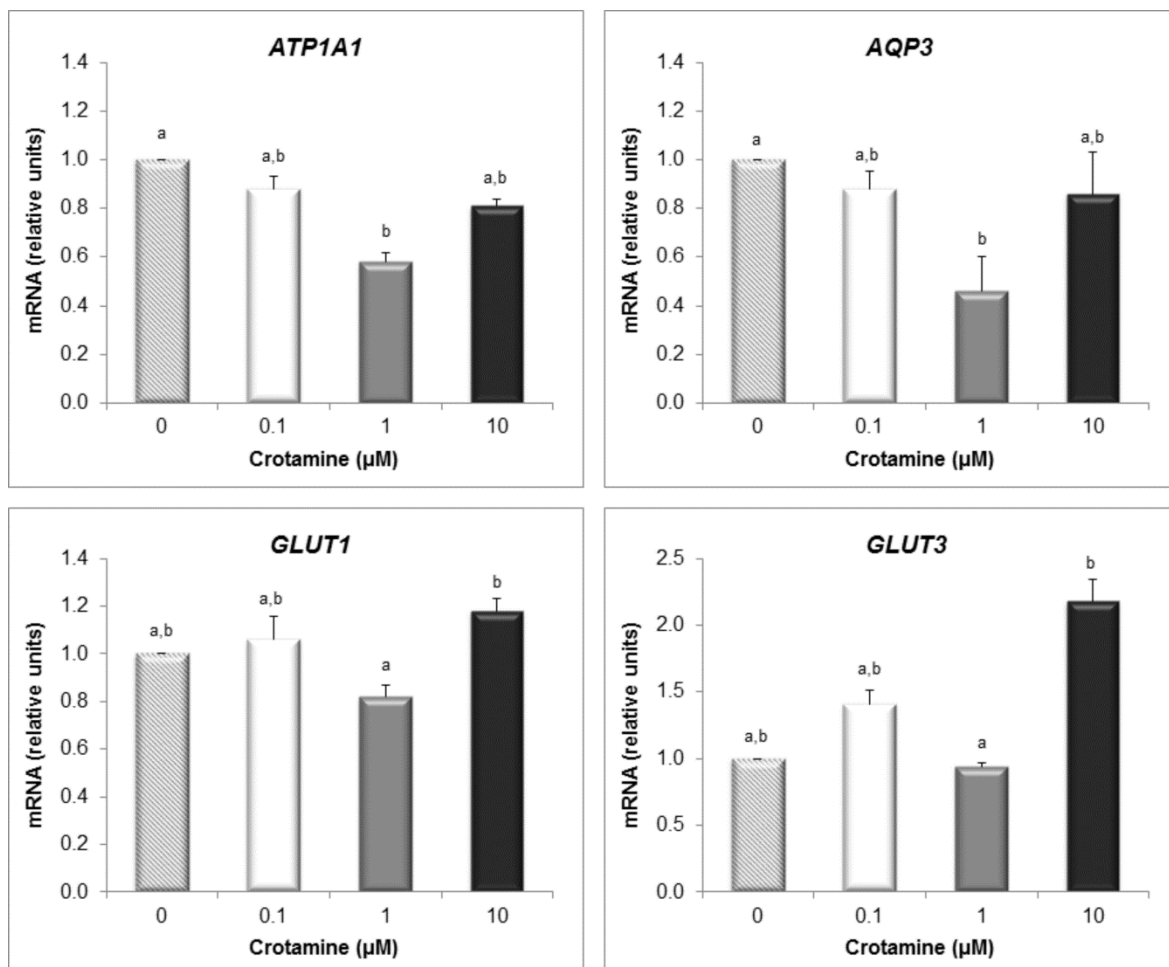


Fig. 2. Effect of crotonamine concentration on gene expression of *in vitro* produced embryos. Quantification of *ATP1A1*, *AQP3*, *GLUT1* and *GLUT3* transcripts were performed by qPCR using *GAPDH* and *H2A* as reference genes. The vehicle group (0 μM crotonamine) was used as calibrator. Bars with different superscripts (a,b) are significantly different at $P < 0.05$.

7 CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que a incubação com crotamina 0,1 μ M por diferentes tempos não prejudicou o desenvolvimento embrionário, sendo possível realizar incubações com crotamina por até 24 h. Além disso, a incubação com concentrações crescentes de crotamina por 24 h, também não apresentou efeito sobre a produção de blastocistos, demonstrando a ausência de embriotoxicidade da crotamina nas diferentes concentrações testadas. Assim, é possível utilizar crotamina no meio de cultivo com concentrações variando entre 0,1 e 10 μ M e período de incubação até 24 h.

8 PERSPECTIVAS

A ausência de toxicidade da crotamina nas condições testadas permite a utilização dessa molécula na produção *in vitro* de embriões sem redução na taxa de produção de blastocistos. Contudo, para alguns dos genes analisados, foram vistas alterações nas suas expressões. Desta forma, mais estudos relacionando expressão gênica e desenvolvimento em embriões bovinos incubados com crotamina são necessários.

Por fim, sabendo-se da capacidade peculiar da crotamina em formar um complexo com DNA plasmideal, estudos posteriores utilizando a crotamina para a produção de embriões transgênicos *in vitro* nas condições propostas são importantes. Nesse contexto torna-se interessante verificar a possível atuação da crotamina como um carreador efetivo de moléculas de DNA para o embrião, tendo em vista a possibilidade de utilização da crotamina como novo método para a produção de mamíferos transgênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; NAVARRETE-SANTOS, A.; WRENZYCKI, C.; GANDOLFI, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. Glucose transporter expression is developmentally regulated in *in vitro* derived bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 370–376, 2001.
- BACCI, M.L. A brief overview of transgenic farm animals. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 9–14, 2007.
- BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. **Theriogenology**, v. 57, p. 275–284, 2002.
- BALDASSARRE, H.; WANG, B.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N.; Effect of GnRH injection timing in the production of pronuclear-stage zygotes used for DNA microinjection. **Zygote**, v. 12, p. 257–261, 2004.
- BARCROFT, L.C.; OFFENBERG, H.; THOMSEN, P.; WATSON, A.J. Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. **Developmental Biology**, v. 256, p. 342–354, 2003.
- BAVISTER, B.; YANAGIMACHI, R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 228–237, 1977.
- BODROGI, L.; BRANDS, R.; RAABEN, W.; SEINEN, W.; BARANYI, M.; FIECHTER, D.; BOSZE, Z. High level expression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the milk of transgenic rabbits. **Transgenic Research**, v. 15, p. 627–636, 2006.
- CAMARGO, L.S.A.; BOITE, M.C.; WOHLRES-VIANA, S.; MOTA, G.B.; SERAPIAO, R.V.; SA, W.F.; VIANA, J.H.M.; NOGUEIRA, L.A.G. Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced *in vitro*. **Cryobiology**, v. 63, p. 256–262, 2011.
- CAMPOS, V.F.; LEON, P.M.M.; KOMNINOU, E.R.; DELLAGOSTIN, O.A.; DESCHAMPS, J.C.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T. NanoSMGT: Transgene transmission into bovine embryos using halloysite clay nanotubes or nanopolymer to improve transfection efficiency. **Theriogenology**, v. 76, p. 1552–1560, 2011.
- CARBALLADA, R.; DEGEFA, T.; ESPONDA, P. Transfection of mouse eggs and embryos using DNA combined to cationic liposomes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 56, p. 360–365, 2000.
- CHANG, C.C.; TSENG, K.H. Effect of crotonamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 63, p. 551–559, 1978.

DONNAY, I.; PARTRIDGE, R.J.; LEESE, H.J. Can embryo metabolism be used for selecting bovine embryos before transfer? **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 39, p. 523–533, 1999.

DUSSAULT, A. A.; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological Procedures Online**, v. 8, p. 1–10, 2006.

EBERT, K. M.; SELGRATH, J. P.; DITULLIO, P.; DENMAN, J.; SMITH, T. E.; MEMON, M. A.; SCHINDLER, J. E.; MONASTERSKY, G. M.; VITALE, J. A. GORDON, K. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. **Biotechnology**, v. 9, p. 835–838, 1991.

ELLIOTT, G.; O'HARE, P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. **Cell**, v. 88, p. 223–233, 1997.

FADEL, V.; BETTENDORFF, P.; HERRMANN, T.; AZEVEDO JR., W.F.; de OLIVEIRA, E.B.; YAMANE, T.; WÜTHRICH, K. Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 46, p. 759–767, 2005.

FRANKEL, A.D.; PABO, C.O. Cellular uptake of the TAT protein from human immunodeficiency virus. **Cell**, v. 55, p. 1189–1193, 1988.

GONÇALVES, J.M.; POLSON, A. The electrophoretic analysis of snake venoms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 13, p. 253–259, 1947.

GORDON, J. W.; SCANGOS, G. A.; PLOTKIN, D. J.; BARBOSA, J. A.; RUDDLE, F. H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 7380–7384, 1980.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. London: CAB International, 1994.

GUPTA, B.; LEVCHENKO, T. S.; TORCHILIN, V. P. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 637–651, 2005.

GUPTA, S. K.; BHANDARI, B.; SHRESTHA, A.; BISWAL, B. K.; PALANIAPPAN, C.; MALHOTRA, S. S.; GUPTA, N. Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Research*, v. 349, p. 665–678, 2012.

HAMMER, R. E.; PURSEL, V. G.; REXROAD, C. E.; WALL, R. J.; BOLT, D. J.; EBERT, K. M.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. **Nature**, v. 315, p. 680–683, 1985.

HAYASHI, M.A.; NASCIMENTO, F.D.; KERKIS, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E.B.; PEREIRA, A.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; NADER, H.B.; YAMANE, T.; KERKIS, I.;

TERSARIOL, I.L. Cytotoxic effects of crotamina are mediated through lysosomal membrane permeabilization. **Toxicon**, v. 52, p. 508–517, 2008.

HOUEBINE, L. M. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. **Journal of Biotechnology**, v. 98, p. 145–160, 2002.

HOUEBINE, L. M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, p. 107–121, 2009.

JAENISCH, R.; MINTZ, B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, p. 1250–1254, 1974.

JAENISCH, R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, p. 1260–1264, 1976.

JOLIOT, A.; PERNELLE C.; DEAGOSTINI-BAZIN, H.; PROCHIANTZ, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p. 1864–1868, 1991.

JUSTICE, M.J.; SIRACUSA, L.D.; STEWART, A.F. Technical approaches for mouse models of human disease. **Disease Models & Mechanisms**, v. 4, p. 305–310, 2011.

KEEFER, C. L. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 5–12, 2004.

KERKIS, A.; KERKIS, I.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; OLIVEIRA, E.B.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; PEREIRA, L.V.; YAMANE, T. Crota mine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **The FASEB Journal**, v. 18, p. 1407–1409, 2004.

KERKIS, I.; SILVA, F.S.; PEREIRA, A.; KERKIS, A.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Biological versatility of crota mine – a cationic peptide from a South American rattlesnake. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 19, p. 1515–1525, 2010.

KOREN, E.; TORCHILIN, V.P. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, p. 385–393, 2012.

KRIMPENFORT, P.; RADEMAKERS, A.; EYESTONE, W.; VAN DER SCHANS, A.; VAN DEN BROEK, S.; KOOIMAN, P.; KOOTWIJK, E.; PLATENBURG, G.; PIEPER, F.; STRIJKER, R.; DE BOER, H. Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production. **Biotechnology**, v. 9, p.844–847, 1991.

KUES, W.A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 286–294, 2004.

KUES, W.A.; NIEMANN, H. Advances in farm animal transgenesis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, p. 146–156, 2011.

KUZMANY, A.; HAVLICEK, V.; WRENZYCKI, C.; WILKENING, S.; BREM, G.; BESENFELDER, U. Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. **Theriogenology**, v. 75, p. 482–494, 2011.

LAURE C. J. The primary structure of crotonamine. **Hoppe Seylers Z Physiological Chemistry**, v. 356, p. 213–215, 1975.

LAVITRANO, M.; CAMAIONI, A.; FAZIO, V.M.; DOLCI, S.; FARACE, M.G.; SPADAFORA, C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. **Cell**, v. 57, p. 717–723, 1989.

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

LINDGREN, M.; HALLBRINK, M.; PROCHIANTZ, A.; LANGEL, U. Cell-penetrating peptides. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 99–103, 2000.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

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

MACHADO, G.M.; CAIXETA, E.S.; LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Post-hatching development of bovine embryos *in vitro*: the effects of tunnel preparation and gender. **Zygote**, v. 20, p. 123–134, 2011.

MATAVEL, A.C.S.; FERREIRA-ALVES, D.L.; BEIRÃO, P.S.L.; CRUZ, J.S. Tension generation and increase in voltage-activated Na⁺ current by crotonamine. **European Journal of Pharmacology**, v. 348, p. 167–173, 1998.

MEMILI, E.; FIRST, N.L. Zygotic and embryonic expression in cow: a review of timing and mechanisms of early expression as compared with other species. **Zygote**, v. 8, p. 87–96, 2000.

NASCIMENTO, F.D.; HAYASHI, M.A.; KERKIS, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E.B.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; NADER, H.B.; YAMANE, T.; TERSARIOL, I.L.S.; KERKIS, I. Crotonamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. **The Journal of Biological and Chemistry**, v. 282, p. 21349–21360, 2007.

NASCIMENTO, F.D.; SANCEY, L.; PEREIRA, A.; ROME, C.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E.B.; NADER, H.B.; YAMANE, T.; KERKIS, I.; TERSARIOL, I.L.S.; COLL, J.; HAYASHI, M.A.F. The natural cell-penetrating peptide crostamine targets tumor tissue in vivo and triggers a lethal calcium-dependent pathway in cultured cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, p. 211–221, 2012.

NICASTRO, G.; FRANZONI, L.; de CHIARA, C.; MANCIN, A.C.; GIGLIO, J.R.; SPISNI, A. Solution structure of crostamine, a Na⁺ channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 1969–1979, 2003.

NIEMANN, H.; KUES, W. A. Transgenic livestock: premises and promises. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 277–293, 2000.

NIEMANN, H.; KUES, W. A. Transgenic farm animals: an update. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 762–770, 2007.

OEHLKE, J.; SCHELLER, A.; WIESNER, B.; KRAUSE, E.; BEYERMANN, M.; KLAUSCHENZ, E.; MELZIG, M.; BIENERT, M. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 11, p. 127–139, 1998.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crostamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, p. 363–370, 2005.

OVERSTRÖM, E.W. *In vitro* assessment of embryo viability. **Theriogenology**, v. 45, p. 3–16, 1996.

PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L.; HAMMER, R. E.; TRUMBAUER, M. E.; ROSENFELD, M. G.; BIRNBERG, N. C.; EVANS, R. M. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. **Nature**, v. 16, p. 611–615, 1982.

PEIGNEUR, S.; ORTS, D.J.B.; SILVA, A.R.P.; OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; OLIVEIRA, E.B.; ZAHARENKO, A.J.; FREITAS, J.C.; TYTGAT, J. Crostamine pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of K_v channels. **Molecular Pharmacology**, v. 82, p. 90–96, 2012.

PEREYRA-BONNET, F.; BEVACQUA, R.; LA ROSA, I.; SIPOWICZ, P.; RADRIZZANI, M.; FERNANDEZ-MARTIN, R.; SALAMONE, D. Novel methods to induce exogenous gene expression in SCNT, parthenogenic and IVF preimplantation bovine embryos. **Transgenic Research**, v. 20, p. 1379–1388, 2011.

POOGA, M.; HÄLLBRINK, M.; ZORKO, M.; LANGEL, U. Cell penetration by transportan. **The FASEB Journal**, v. 12, p. 67–77, 1998.

POON, G.M.; GARIÉPY, J. Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 788–793, 2007.

PURSEL, V. G.; WALL, R. J.; REXROAD JR, C. E.; HAMMER, R. E.; BRINSTER, R. L. A rapid whole-mounted staining products for nuclei of mammalian eggs. **Theriogenology**, v. 24, p. 687–691, 1985.

PURCELL, S.H.; MOLEY, K.H. Glucose transporters in gametes and preimplantation embryos. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, p. 483–489, 2009.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; OGUIURA, N.; HAYASHI, M. A.; CAMARGO, M. E.; GREGO, K. F.; OLIVEIRA, E. B.; YAMANE, T. Nucleotide sequence of crotamine isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 37, p. 973–984, 1999.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, I. Crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from rattlesnake venom with cell-penetrating properties. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 4351–4361, 2011.

RICHARD, J. P.; MELIKOV, K.; VIVES, E.; RAMOS, C.; VERBEURE, B.; GAIT, M. J.; CHERNOMORDIK, L. V.; LEBLEU, B. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 585–590, 2003.

RIDEOUT, W. M.; EGGAN, K.; JAENISCH, R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. **Science**, v. 293, p. 1093–1098, 2001.

RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N.M.; BETTERIDGE, K.J. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 95, p. 585–595, 1992.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 234–248, 2002.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 44–50, 2008.

RIZZI, C.T.; CARVALHO-DE-SOUZA, J.L.; SCHIAVON, E.; CASSOLA, A.C.; WANKE, E.; TRONCONE, L.R. Crotamine inhibits preferentially fast-twitching muscles but is inactive on sodium channels. **Toxicon**, v. 50, p. 553–562, 2007.

SCHNIEKE, A.E.; KIND, A.J.; RITCHIE, W.A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A.R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K.H.S. Human factor IX

transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v. 278, p. 2130–2133, 1997.

TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, p. 90–100, 1990.

TORCHILIN, V.P. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 343–375, 2006.

TYAGI, M.; RUSNATI, M.; PRESTA, M.; GIACCA, M. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 3254–3261, 2001.

VICHERA, G.; MORO, L.; SALAMONE, D. Efficient transgene expression in IVF and parthenogenetic bovine embryos by intracytoplasmic injection of DNA–liposome complexes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 214–220, 2011.

WATSON, A.J.; WESTHUSIN, M.E.; DE SOUSA, P.A.; BETTS, D.H.; BARCROFT, L.C. Gene expression regulating blastocyst formation. **Theriogenology**, v. 51, p. 117–133, 1999.

WHEELER, M. B.; WALTERS, E. M.; CLARK, S. G. Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 265–289, 2003.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSWE, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, p. 23–35, 2005.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Timing of blastocyst expansion affects spatial messenger RNA expression patterns of genes in bovine blastocysts produced *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 2073–2080, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A

RESUMO PUBLICADO: Anais da XVII Semana Universitária da UECE, 2012.

COMPARAÇÃO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE CROTAMINA EM UM COMPLEXO PEPTÍDEO-DNA PARA TRANSFEÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

Campelo, I.S.; Lopes, C.E.B.; Alcântara Neto, A.S.; Melo, L.M.; Rádis-Baptista, G.;
Pereira, A.F.; Freitas, V.J.F.

O uso de animais transgênicos para diferentes aplicações biotecnológicas tem levado ao aumento no interesse em melhorar a eficiência dos métodos de obtenção desses animais. Nesse contexto, Pereira et al. (2012, Anim Reprod 9, 637) mostraram a ação da crotamina – uma molécula isolada do veneno da cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) – na concentração de 50 ng. μL^{-1} como agente de transfecção em embriões bovinos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi verificar a eficiência de transfecção dessa molécula em concentração inferior a anteriormente proposta. Este projeto foi aprovado pelo CEUA/UECE (nº 10460190-6). Embriões bovinos oriundos de produção *in vitro* íntegros e recém-fecundados foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: incubação por 24 h na ausência (Cr0) e presença de complexo crotamina-pEGFP-N1 nas concentrações finais de 5 (Cr5) e 50 ng. μL^{-1} (Cr50) de crotamina. Após esse período, os embriões foram cultivados em meio CR2 a 38,5°C e 5% de CO₂ por oito dias. As taxas de desenvolvimento embrionário e transfecção (embriões EGFP⁺/embriões cultivados) foram avaliadas em D7 e D8 do cultivo *in vitro*. Os dados foram expressos em percentual e analisados pelo teste exato de Fischer (P<0,05). Após dez repetições, 1958 oócitos foram recuperados de 472 ovários puncionados, perfazendo um total de 4,1 oócitos/ovário. Destes, 902 oócitos foram distribuídos nos grupos Cr0 (n=295), Cr5 (n=298) e Cr50 (n=309). As taxas de blastocistos, em D7, foram de 23,7% (70/295), 18,8% (56/298) e 21,0% (65/309) para os grupos Cr0, Cr5 e Cr50, respectivamente. Já em D8, as taxas de blastocistos nos grupos Cr0, Cr5 e Cr50 foram 28,8% (85/295), 23,1% (69/298) e 24,9% (77/65), respectivamente. Quanto à transfecção, em D7, 26,8% (15/56) e 15,4% (10/65) e, em D8, 24,6% (17/69) e

14,3% (11/77) dos blastocistos dos grupos Cr5 e Cr50 expressaram EGFP. O desenvolvimento embrionário não foi afetado pelos tratamentos em D7 e D8 ($P>0,05$). Em ambas as concentrações avaliadas, as taxas de transfecção foram similares tanto em D7 quanto em D8 ($P>0,05$). Como esperado, nenhum embrião do grupo Cr0 apresentou expressão de EGFP. Em conclusão, a crotamina foi capaz de transfectar embriões bovinos íntegros e a concentração de $5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ possui o mesmo potencial de transfecção da concentração de $50 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Outros estudos encontram-se em andamento para melhorar a eficiência da transgênese com esta nova metodologia.

In: XVII Semana Universitária da UECE, 2012.

APÊNDICE B

RESUMO PUBLICADO: Anais da XVII Semana Universitária da UECE, 2012.

OBTENÇÃO DE EMBRIÕES CAPRINOS TRANSGÊNICOS POR TRANSFEÇÃO
COM COMPLEXO CROTAMINA-DNA

Furtado, J.A.; Lopes, C.E.B.; **Campelo, I.S.**; Teixeira, D.I.A.; Melo, L.M.; Freitas, V.J.F.;
Pereira, A.F.

A investigação de novas ferramentas em transgênese pode aumentar a eficiência desta biotécnica em diferentes espécies animais, especialmente a caprina. Os peptídeos de penetração celular tais como a crotamina, podem ser utilizados como moléculas carreadoras de material genético exógeno para o interior de embriões bovinos. Assim, o presente projeto propõe produzir embriões caprinos transgênicos por transfecção utilizando complexo crotamina-pEGFP-N1. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE nº 11044714-0/31). Para a produção *in vitro* de embriões caprinos, serão utilizados complexos *cumulus*-oócito (CCOs) oriundos de cabras submetidas à colheita oocitária por laparoscopia (COL). Para tanto, estas terão seu estro sincronizado com esponjas intravaginais com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon, Buenos Aires, Argentina) por 10 dias associado a 75 µg de cloprostenol (Prolise, Buenos Aires, Argentina) no oitavo dia. Para a estimulação ovariana, as cabras receberão múltiplas administrações de NIH-FSH-P1 (180 mg; Folltropin-V, Vetrepfarm, Belleville, Canadá) às 36 h antes da retirada da esponja. Os folículos, visualizados por laparoscopia e maiores que 2 mm, serão aspirados, logo após a remoção da esponja, usando um sistema de aspiração para pequenos ruminantes (WTA, Cravinhos, Brasil). Após cada sessão de COL (n=6), os CCOs serão classificados, selecionados e maturados *in vitro*. Após essa etapa, os CCOs serão fecundados *in vitro* por 12 h numa concentração espermática de 4×10^6 sptz/mL a 38,5°C em 5% de CO₂. Em seguida, os presumíveis zigotos serão distribuídos em dois grupos: incubados por 24 h na ausência (Cr0) e presença do complexo crotamina-pEGFP-N1 na concentração final de 50 ng/ul de crotamina (Cr1). Após esse período, todos os embriões serão cultivados por oito dias em SOF suplementado a 38,5°C em 5% de CO₂, 90% de N₂ e 5% de O₂. As taxas de

desenvolvimento embrionário e transfecção serão avaliadas em D2, D7 e D8 do cultivo *in vitro* sob microscopia de fluorescência. Todos os dados serão analisados conforme teste estatístico apropriado.

In: XVII Semana Universitária da UECE, 2012.

APÊNDICE C

RESUMO PUBLICADO: *Animal Reproduction*, 9: 637, 2012.

OBTAINING TRANSGENIC BOVINE EMBRYOS USING CROTAMINE AS A
FOREIGN DNA CARRIER MOLECULE

Pereira, A.F.; **Campelo, I.S.**; Alcântara Neto, A.S.; Teixeira, D.I.A.; Melo, L.M.; Rádis-Baptista, G.; Freitas, V.J.F.

Currently, several methods are used for generation of transgenic animals, such as pronuclear microinjection, nuclear transfer and others. Despite the great advances, animal transgenesis still presents a low efficiency and, consequently, other methodologies have been developed. Kerkis et al. (2004, *FASEB J*, 18, 1407-9) and Nascimento et al. (2007, *J Biol Chem* 282, 21349-60) verified crotamine action – a cationic peptide from the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) – as a penetration and transfection agent in several murine cell types. Therefore, the aim of this work was to evaluate crotamine as a DNA carrier molecule for the production of transgenic bovine embryos. Crotamine-plasmid DNA complex (Cr-pEGFP) was used to transfect *in vitro* produced bovine embryos according to Vichera et al. (2011, *Reprod Dom Anim* 46, 214-20). Two groups of *in vitro*-fertilized intact oocytes were then constituted: one group, incubated for 24 h in the absence (Cr0), and another, in the presence of Cr-pEGFP complex (Cr1) at a final concentration of 50 ng.µL⁻¹ crotamine per µg of DNA. After this period, the embryos were cultured in CR2 medium for seven days at 38.5°C and 5% CO₂. Following several repetitions (n=7), embryonic development and transfection rates were evaluated by fluorescence microscopy on successive days (D2, D7 and D8) of *in vitro* culture. Cleavage, blastocyst, hatching and transfection rates were analyzed using ANOVA in combination with Tukey test (P<0.05). The cleavage rates of Cr0 and Cr1, evaluated on D2, were 63.8% (127/199) and 63.2% (134/212), respectively. The blastocyst rate on D7, calculated in relation to the total number of oocytes in culture, was 25.1% (50/199) and 24.1% (51/212) for the Cr0 and Cr1 groups, respectively. On D8, the blastocyst rates in Cr0 and Cr1 were 29.6% (59/199) and 26.4% (56/212), respectively. Also on D8, the hatching rates in Cr0 and Cr1 were 45.8% (27/59) and 46.4% (26/56), respectively. In all

embryonic stages, crotamine did not affect the viability of bovine embryos, as confirmed by cleavage and blastocyst rates ($P>0.05$). Interestingly, concerning the transfection rate, 9.8% (5/51) and 17.9% (10/56) of blastocysts expressed EGFP on D7 and D8, respectively. Neither embryos on D2, nor oocytes in Cr0 group, showed EGFP transgene expression. Altogether, these results present evidences about the competence of crotamine to mediate bovine embryo transfection, without the removal of the zona pellucida or the use of DNA microinjection. In conclusion, crotamine-mediated transfection appears as a promising alternative for the production of transgenic bovine embryos. Additional studies are being undertaken to improve the knowledge about this new methodology and to make possible its application for animal transgenesis.

In: XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2012, Foz do Iguaçu.

APÊNDICE D

RESUMO PUBLICADO: *Animal Reproduction*, **9**: 587, 2012.

EFFECT OF THE NUMBER OF LAPAROSCOPIC OOCYTE RECOVERY SESSIONS
IN CANINDÉ GOATS ON THE EFFICIENCY OF OOCYTE PRODUCTION IN AN
IVEP SYSTEM

Freitas, V.J.F.; Souza, J.M.G.; Batista, R.I.T.P.; Melo, C.H.S.; Vieira, M.P.; Alcântara
Neto, A.S.; **Campelo, I. S.**; Pereira, A.F.; Melo, L.M.; Teixeira, D.I.A.

In vitro embryo production (IVEP) can become an excellent tool for genetic improvement and preservation of goat breeds. However, for this, it is necessary the use of gametes (spermatozoa and oocytes) derived from genetically superior and pure specimen. Concerning the female, laparoscopic oocyte recovery (LOR) can be the appropriate method. However, in Canindé goats there is no study on the effect of repeated LOR in the same oocyte donor. The objective of this study was to observe the response of donors after successive sessions for the oocyte production in an IVEP system. For this purpose, it was used 16 adult and cyclic Canindé goats, which were submitted to two or three treatments for hormonal ovarian stimulation followed by LOR. All oocyte donors received intravaginal sponges containing 60 mg MAP (Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) for 11 days, combined with an intramuscular (im) injection of 50 µg d-cloprostenol (Ciosin, Coopers, São Paulo, Brazil) on day 8 of progestagen treatment. For ovarian stimulation, goats received a single im injection of 70 mg NIH-FSH-P1 (Folltropin-V, Vetrepfarm, Belleville, Canada) plus 200 IU eCG (Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) 36 h before sponge removal. The interval between each hormonal treatment/LOR was 14 days. LOR was performed under volatile anesthesia and according the procedure cited by Avelar et al. (2012, Anim Reprod, 9, 27-32). The pressure was set at -30 mmHg and all follicles larger than 2 mm were aspirated. The collection medium used was TCM199 supplemented with HEPES, heparin and gentamicin. Once the LOR was completed, each ovary was gently flushed with a heparinized saline. The effect of repeated LOR was analyzed using repeated-measures ANOVA and Tukey's test. There were no statistical differences between the three LOR sessions in the number of

visualized/punctured follicles ($15.3 \pm 5.1/12.7 \pm 4.5$, $15.5 \pm 4.2/12.8 \pm 3.9$ and $14.7 \pm 6.4/11.9 \pm 4.9$, $P > 0.05$). Concerning the recovery rate, there was also no statistical difference between the different sessions, with an average of 71.2, 74.8 and 74.4% ($P > 0.05$) for the first, second and third session, respectively. In conclusion, three LOR sessions did not affect the oocyte production in Canindé goats submitted to hormonal ovarian stimulation aimed at subsequent IVEP.

In: XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2012, Foz do Iguaçu.

APÊNDICE E

RESUMO PUBLICADO: Anais da XVII Semana Universitária da UECE, 2012.

AValiação DO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS
NA PRESENÇA DE COMPLEXO CROTAMINA-pEGFP

Lopes, C.E.B.; **Campelo, I.S.**; Alcântara Neto, A.S.; Melo, L.M.; Rádis-Baptista, G.;
Freitas, V.J.F.; Pereira, A.F.

A baixa eficiência da transgênese em mamíferos tem levado a busca por novas ferramentas que proporcionem aumentar a produção de animais geneticamente modificados. Uma das metas para alcançar tal objetivo seria a utilização de biomoléculas carreadoras do transgene para o interior de embriões. Contudo, antes de avaliar uma molécula como eficiente para a transfecção, é necessário conhecer seu papel sobre a viabilidade embrionária. Portanto, o objetivo do trabalho foi verificar o efeito da crotamina - um peptídeo utilizado para a transfecção de células murinas e oriundo de veneno da cascavel da América do Sul (*Crotalus durissus terrificus*) - sobre o desenvolvimento de embriões bovinos. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em uso de animais (CEUA/UECE) registrado sob o número 11044714-0/31. Assim, complexos *cumulus*-oócito (CCOs) oriundos de ovários de abatedouros foram maturados por 24 h em TCM199 suplementado. Em seguida, oócitos maturados foram fecundados *in vitro* (FIV), conforme Vichera *et al.* (2011, *Reprod Dom Anim* 46, 214-20). Após a FIV, presumíveis zigotos foram distribuídos em dois grupos: incubação na ausência (controle) e presença de complexo crotamina-pEGFP (Cr) por 24 h, numa concentração final de 50 ng.µL⁻¹ de crotamina. Ao final desse período, todos os embriões foram cultivados em meio CR2 a 38,5°C e 5% de CO₂ por sete dias. Após sete repetições, as taxas de desenvolvimento embrionário foram avaliadas por microscopia em D2 e D7 do cultivo *in vitro*. Os blastocistos avaliados em D7 foram classificados quanto ao seu estágio de desenvolvimento em: blastocisto inicial (Bi), blastocisto (B), blastocisto expandido (Bx) e eclodido (Be). Os dados foram expressos em percentual e analisados pelo teste exato de Fisher (P<0,05). Um total de 208 ovários resultou em 818 CCOs recuperados, perfazendo uma média de 3,9 CCOs/ovário. Destes, 522 foram distribuídos em 254 e 268 para os grupos controle e Cr, respectivamente. As

taxas de clivagem dos grupos controle e Cr, avaliadas em D2, foram 45,3% (115/254) e 39,9% (107/268). A taxa de blastocisto em D7, calculada em relação ao número total de estruturas em cultivo foi de 21,6% (55/254) e 16,4% (45/268) para os grupos controle e Cr, respectivamente. Quanto à qualidade embrionária avaliada em D7, a seguinte distribuição foi observada entre os diferentes estágios avaliados: Bi (1,8% vs. 4,4%), B (18,2% vs. 11,1%), Bx (69,1% vs 75,6%) e Be (10,9% vs. 8,9%) para os grupos controle e Cr, respectivamente. Em todos os estágios embrionários, a incubação com crotamina não afetou a viabilidade dos embriões bovinos, em termos de taxas de clivagem e de blastocistos ($P>0,05$). Dessa forma, pode-se concluir que a crotamina não afetou a viabilidade embrionária dos embriões bovinos cultivados *in vitro*. Estudos adicionais encontram-se em andamento para a validação desta molécula como agente de transfecção em embriões bovinos.

In: XVII Semana Universitária da UECE, 2012, Fortaleza.

APÊNDICE F

RESUMO PUBLICADO: *Acta Science Veterinarie*, **39 (Supl. 1):** 411, 2011.

IN VITRO EMBRYO PRODUCTION (IVEP) AFTER LAPAROSCOPIC OOCYTE
RECOVERY (LOR) IN CANINDÉ GOATS

Pereira, A.F.; Moura, R.R.; Batista, R.I.T.P.; Souza, J.M.G.; Alcântara Neto, A.S.; Melo, C.H.S.; **Campelo, I.S.**; Vieira, M.P.; Teixeira, D.I.A.; Melo, L.M.; Freitas, V.J.F.

Currently, a major concern of livestock is the biodiversity preservation. In Northeast Brazil, there are several naturalized goat breeds at risk of extinction, including the Canindé. Reproductive biotechnologies could participate in this process. From these, IVEP after LOR may accelerate the genetic material recovery. Nevertheless, few studies demonstrate the real efficiency of this system in goats. Therefore, the aim of this study was to evaluate the IVEP coupled with LOR as biotechnique to create an embryo bank for the preservation of Canindé goats. Thus, 20 adult and cyclic goats (five females per session) received intravaginal sponges with 60 mg medroxyprogesterone acetate (Progespon, Buenos Aires, Argentina) for 11 days associated with 70µg cloprostenol (Prolise, Buenos Aires, Brazil) in the eighth day. Thirty-six hours before sponge removal, animals received 70 mg pFSH (Folltropin, Ontario, Canadá) and 200 IU eCG (Novormon, Buenos Aires, Argentina). The follicles, visualized by laparoscopy, were classified as small (< 3mm), medium (3 to 4 mm) and large (> 4mm) and aspirated just after the sponge removal using an aspiration system for small ruminants (Watanabe, Cravinhos, Brazil). *Cumulus*-oocyte complexes (COCs) were recovered and classified (grade I to IV) based in the presence of *cumulus* cells and cytoplasm homogeneity. Grade I and II structures were matured in modified TCM199, for 24 h at 38.5°C and 5% CO₂. After this period, COCs were fertilized with fresh spermatozoa (2x10⁶ sperm/mL) in SOF-FIV medium supplemented with heparin for 16 h in the same maturation conditions. The presumptive zygotes were cultured in SOF-CIV medium, in the same fertilization conditions, for seven days. A total of 245 follicles were punctured and distributed in small (31.5%), medium (35.9%) and large (32.6%). The oocyte recovery rate was 74.3% (182/245) with an average of 9.1 oocytes per goat. Regarding to oocyte quality,

13.2% (24/182), 68.1% (124/182), 5.5% (10/182) and 13.2% (24/182) were classified as grade I, II, III and IV, respectively. The average of COCs submitted to maturation (grade I and II) was 7.5 per goat. From the presumptive zygotes *in vitro* incubated, 58.3% (84/144) cleaved after 48 h of culture. The blastocyst rate was 52.1% (75/144) regarding the total number of structures in culture. The total percentage of blastocyst in relation to cleaved embryos was 89.3% (75/84). In conclusion, the IVEP/LOR system was efficient to produce Canindé goat blastocysts and may be used in the creation of an embryo bank in order to preserve the breed.

In: XXV Reunião Anual da SBTE, 2011, Cumbuco.