UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Pâmela Santana Ferreira

DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES CLONES BOVINOS RECONSTRUÍDOS COM OÓCITOS COLETADOS DE ANIMAIS VIVOS OU POST-MORTEM

Juiz de Fora
2022

PÂMELA SANTANA FERREIRA

DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES CLONES BOVINOS RECONSTRUÍDOS COM OÓCITOS COLETADOS DE ANIMAIS VIVOS OU POST-MORTEM

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

Orientador: Dr, Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Juiz de Fora
2022

PÂMELA SANTANA FERREIRA

DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES CLONES BOVINOS RECONSTRUÍDOS COM OÓCITOS COLETADOS DE ANIMAIS VIVOS OU POST-MORTEM

Folha de Aprovação:

_____

Orientador
Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Embrapa Gado de Leite - UFJF

_____

Convidada
Dra. Naiara Zoccal Saraiva
Embrapa Gado de Leite

_____

Convidado
Dr. Carlos M. C. Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

AGRADECIMENTOS

Encerro aqui mais uma etapa da minha vida. Quando eu era estagiária, olhava o laboratório de reprodução animal da Embrapa Gado de Leite e pensava: uau! Meu sonho!

Que coisa, não? Passo no mestrado da UFJF, podendo escolher meu orientador e o lugar que faria meu experimento!! Onde escolhi? Óbvio! O laboratório de reprodução animal da Embrapa Gado de Leite!

E eu venci. Mesmo tendo um filho pequeno, com pandemia, ansiedade, mesmo com a vida tentando pregar mil peças: eu consegui!
Hoje só quero agradecer do fundo do meu coração a todos que me ajudaram chegar até aqui.

Em especial, primeiramente agradeço a minha ex-professora e amiga Aline, que me deu força e me encorajou a não desistir de fazer a prova.

A minha amiga Fernanda, obrigada pela parceria, pelos trabalhos feitos, pelo perfeccionismo junto comigo, pela amizade que construímos, por tudo! Vou levar você para vida!

Ao meu ex-professor, meu amigo, Giuliano que foi minha dupla tantas vezes nas disciplinas. Jamais vou esquecer o que fez por mim lá dentro!

A Jess, Diana e Gustavo pela acolhida maravilhosa no laboratório! Obrigada mil vezes!

A Eliza, o que seria de mim sem você??? Mais um anjinho na minha vida!

Aos meus amigos aqui de fora que foram meu alicerce nos dias difíceis, por cada palavra e gesto de conforto nesses 3 anos.

Agradeço à UFJF e a CAPES pela grande oportunidade de poder executar meu projeto.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Luiz Sérgio Camargo, que não mediu esforços para me auxiliar.

Meu muito obrigada a todos!

RESUMO

Os ovários recuperados post-mortem em abatedouro comercial geralmente são a principal fonte de oócitos utilizados como doadores de citoplasma para transferência nuclear de células somáticas. Entretanto, esses ovários são provenientes de doadoras com estado reprodutivo ou nutricional desconhecido, podendo, assim, comprometer a qualidade do oócito. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da fonte oocitária, a partir da coleta de oócitos (OPU) de animais vivos ou de abatedouros obtidos de animais post-mortem na produção de blastocistos TNCS, apoptose e número total de células dos blastocistos TNCS. Os oócitos foram recuperados por OPU (grupo OPU) ou a partir de ovários recuperados post-mortem de vacas de origem desconhecida em um abatedouro comercial local (grupo Abatedouro). Os embriões TNCS foram reconstruídos com oócitos enucleados maturados in vitro de ambos os grupos e cultivados por 168 h pós-ativação. Embriões fertilizados in vitro (FIV) e partenogenéticos foram usados como controles. Nenhuma diferença ($P>0,05$) foi encontrada nas taxas de fusão, clivagem e blastocistos entre os grupos OPU e Abatedouro, mas blastocistos TNCS de oócitos derivados de OPU tiveram índice de apoptose semelhante ($P>0,05$) aos blastocistos FIV em comparação aos blastocistos TNCS de oócitos derivados de abatedouro ($P<0,05$). Em conclusão, a fonte de oócito para TNCS tem baixo impacto na produção de blastocistos, porém, pode ter efeito sobre a apoptose embrionária.

Palavras-chave: clonagem, células somáticas, embriões bovinos

ABSTRACT

The main source of oocytes used as cytoplasm donor for somatic cell nuclear transfer (SCNT) is usually ovaries recovered post-mortem at commercial abattoir. However, such ovaries come from donors with unknown reproductive or nutritional status, what could compromise the oocyte quality. The present study aimed to evaluate the effect of oocyte source, from ovum pick-up (OPU) obtained from live animals or from abattoir obtained from post-mortem animals, on production of SCNT blastocysts, apoptosis and total cells number of SCNT blastocysts. Oocytes were recovered by OPU (OPU group) or from ovaries recovered post-mortem from cows of unknown origin at a local commercial abattoir (Abattoir group). SCNT embryos were reconstructed with *in vitro*-matured enucleated oocytes from both groups and cultured for 168 h post-activation. *In vitro*-fertilized (IVF) and parthenogenetic embryos were used as controls. No difference ($P>0.05$) was found on fusion, cleavage, and blastocysts rates between OPU and Abattoir groups, but SCNT blastocysts of OPU-derived oocytes had similar ($P>0.05$) apoptosis index to IVF blastocyst in contrast to SCNT blastocysts of abattoir-derived oocytes ($P<0.05$). The source of oocyte for SCNT has low impact on blastocyst yield. However, it can influence the abundance of specifics transcripts stored in the ooplasm after *in vitro* maturation and can have an effect on embryo apoptosis.

Key words: cloning, somatic cells, bovine embryos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do processo de clonagem utilizando a transferência nuclear por células somáticas..... 11

Figura 2. Imagens dos embriões referentes aos quatro tratamentos: A (TNCS-OPU), B (TNCS-Abatedouro), C (Partenogenéticos) e D (Fertilizados *in vitro*)..... 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos TNCS derivados de oócitos OPU (grupo TNCS-OPU) ou de oócitos obtidos de ovários recuperados a partir de ovários recuperados de vacas desconhecidas *post mortem* em abatedouro (grupo TNCS-Abatedouro)..... 25

Tabela 2. Número total de células e células apoptóticas de blastocistos derivados de oócitos OPU (grupo TNCS-OPU) ou de oócitos obtidos de ovários de abatedouros provenientes de vacas desconhecidas (grupo TNCS-Abatedouro)..... 26

LISTA DE ABREVIATURAS

MIV Maturação *in vitro*

PIV Produção *in vitro*

CIV Cultivo *in vitro*

CC Células do cumulus

CCO Complexo cumulus oócito

GV Germinative vesicle (Vesícula germinativa)

TCM-199 *Tissue Culture Medium* 199 (Meio de cultura de tecido 199)

SOF *Sintetic Ovituct Fluid* (Fluido sintético do oviduto)

PBS Phosphate-buffered saline (Tampão fosfato salino)

DMSO Dimetilsulfóxido

FSH Follicle stimulating hormone (Hormônio folículo estimulante

PVA Polyvinyl alcohol (Álcool polivinil)

PBS Phosphate bufferid saline (Tampão fosfato salino)

TNCS Transferência Nuclear com Células Somáticas

TUNEL Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase)

SFB Soro fetal bovino

SNK Student Newman Keulus

BSA Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)

GLM Modelo Linear Geral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... **10**
1.1 Histórico da clonagem **12**
1.2 Transferência nuclear com células somáticas..... **15**
1.2.1 Célula doadora e Célula receptora..... **15**
1.2.1.1 *Células somáticas como doadoras de núcleo*..... **15**
1.2.1.2 *Células tronco como doadoras de núcleo*.....**16**
1.2.1.3 *Células receptoras de núcleo*..... **17**
1.3 Desenvolvimento in vitro de embriões derivados de TNCS..... **18**
1.4 Problemas relacionados à clonagem..... **19**
2 OBJETIVOS **21**
2.1 Objetivo geral..... **21**
2.2 Objetivos específicos..... **21**
3. METODOLOGIA..... **22**
3.1 Maturação *in vitro*..... **22**
3.2 Fecundação *in vitro.*..... **22**
3.3 Cultura de células doadoras..... ***2*3**
3.4 Transferência Nuclear com Células Somáticas e ativação do oócito.... **23**
3.5 Cultivo *in vitro*..... **23**
3.6 Ensaios de apoptose e número total de células de blastocistos..... **24**
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... **24**
5 RESULTADOS..... **25**
5.1 Produção de embriões por TNCS..... **25**
5.2 Apoptose e número total de células de blastocistos TNCS..... **26**
6 DISCUSSÃO..... **28**
7 CONCLUSÕES..... **30**
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGÁFICAS..... **30**

1. INTRODUÇÃO

Devido a sua importância na agricultura, a espécie bovina é o foco de pesquisas no avanço de tecnologias reprodutivas, com o objetivo de aumentar a produção de genótipos superiores nas indústrias de laticínios e de carne bovina (GALLI et al., 2003).

Os avanços biológicos e tecnológicos são divididos em quatro gerações de tecnologias da reprodução: inseminação artificial e criopreservação de gametas e embriões como 1ª geração; superovulação e transferência de embriões fazendo parte da 2ª geração; a sexagem espermática e embrionária, a recuperação de ovócitos e a fertilização *in vitro* encontram-se na 3ª geração; e a 4ª geração envolvendo a clonagem por transferência nuclear de células embrionárias ou somáticas, a transgenia e a biologia de células-tronco (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009).

Em combinação com as tecnologias reprodutivas, a clonagem fornece possibilidades ilimitadas para a agricultura (por exemplo, inserir genes que afetam a produção de leite e carne bovina), bem como para a biomedicina (por exemplo, produzir proteínas importantes no leite, geração de células e tecidos) (RODGES e STICE, 2003).

A Transferência Nuclear com Células Somáticas (TNCS) é uma tecnologia no qual o núcleo (DNA) de uma célula somática é transferido para um oócito enucleado em metáfase II para a geração de um novo indivíduo, geneticamente idêntico ao doador da célula somática (Figura 1). É uma poderosa técnica a fim de se produzir animais geneticamente modificados que podem ser utilizados como biorreatores, na conservação e regeneração dos recursos genéticos (PEREIRA e FREITAS, 2009; NIEMANN e HAHN, 2012; ZHOU et al. 2015).

Além disso, a TNCS é a única biotecnologia capaz de garantir que o indivíduo resultante conserve todos os genes do seu progenitor, já que não haverá *crossing over* (MOGOLLÓN-WALTERO et al., 2014).

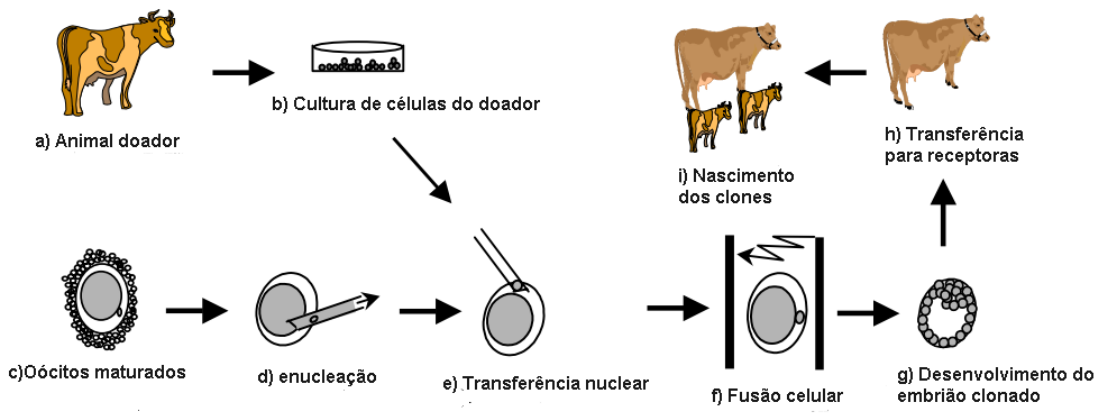

Figura 1: Esquema do processo de clonagem utilizando a transferência nuclear por células somáticas. As células são coletadas do animal doador (a) e cultivadas *in vitro* (b). Um oócito maturado (c) é enucleado (d) e uma célula doadora é transferida para o oócito enucleado (e). A célula somática e o oócito são fundidos (f) e os embriões podem se desenvolver em um blastocisto *in vitro* (g). O blastocisto pode então ser transferido para uma receptora (h) e os animais clonados nascem após a conclusão da gestação (i) (Modificado de TIAN et al., 2003).

O sucesso da transferência nuclear utilizando células somáticas representa um dos maiores avanços obtido no campo da biotecnologia animal, fornecendo uma forma nova e mais rápida de produzir animais transgênicos. Porém, como muitas das limitações de outras técnicas transgênicas, os resultados se mostram, pouco satisfatórios, havendo a necessidade cada vez maior de esclarecimentos a respeito das lacunas ainda presentes na técnica (MIGLINO, 2004). Dessa forma, a reprogramação celular por TNCS, depende fundamentalmente da disponibilidade dos oócitos, da sua qualidade, e dos processos que se iniciam na maturação e chegam ao cultivo *in vitro* (GALLI e LAZZARI, 2008).

A baixa eficiência da clonagem tem limitado as suas aplicações e reflete o quão complicado é a TNCS e o desenvolvimento embrionário. Algumas recomendações e suposições podem ser feitas com a precaução de que, embora compartilhem problemas e resultados semelhantes, provavelmente dois estudos não podem ser comparados diretamente (MALIN; WITKOWSKA-PILASZEWICZ; PAPIS, 2022). Alguns fatores como o tempo entre a fusão e a ativação induzida (AKAGI et al., 2003); a linhagem celular utilizada como doadora de núcleo (TIAN et al., 2003); a coordenação do ciclo celular entre célula doadora e o oócito receptor (CAMPBELL et al., 1996); e o processo de

transferência nuclear por fusão ou microinjeção (KUROME et al., 2003) afetam tanto a viabilidade embrionária quanto a fetal na TNCS. Isso faz com que menos de 10% dos embriões transferidos cheguem a termo. (TAMADA e KIKYO 2004; WELLS, 2005).

Apesar dos temores da clonagem fácil e descontrolada, a prática mostra que 1/4 de século depois pouco se entende sobre o assunto e são necessárias pesquisas inovadoras para que a clonagem seja tão bem sucedida quanto a FIV e a ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides) (MALIN; WITKOWSKA-PILASZEWICZ; PAPIS, 2022).

1.1 Histórico da Clonagem

Em animais, o processo de clonagem pode ser definido como a produção de indivíduos geneticamente idênticos (HEYMAN e RENARD, 1996). A primeira transferência de núcleos, com sucesso, foi realizada por Briggs e King (1952), a partir de células embrionárias de Rã *(Rana pipiens)* irradiadas com luz ultravioleta, em que núcleos haploides de oócitos não fecundados foram substituídos por núcleos diploides procedente de uma célula somática, tornando possível o início do desenvolvimento embrionário. Porém, a TN foi proposta anteriormente, a fim de avaliar o material genético na diferenciação celular demonstrando a teoria da “equivalência nuclear”, em que o núcleo das células diferenciadas seria capaz de iniciar e sustentar o desenvolvimento embrionário e se a cromatina sofreria modificações durante a reprogramação celular (SPEEMANN, 1938).

Experimentos com *Xenopus laveis* e *Rana pipiens* demonstraram que uma célula poderia se diferenciar durante o desenvolvimento embrionário e recuperar a totipotência posteriormente (GURDON, 1962, 1965). A partir daí, diversos experimentos foram desenvolvidos reforçando a teoria de que células embrionárias poderiam ser doadoras de núcleos a fim de se obter animais geneticamente idênticos (SARAIVA et al., 2010; RECUERDA, 2011).

Em mamíferos, a primeira tentativa de clonagem foi em 1975, em coelhos, utilizando vírus Sendai para a reativação (BROMHALL, 1975). Em

1981, a clonagem de camundongos (*Mus musculus*) foi anunciada pela Universidade de Genebra, na Suíça (BROMHALL, 1981).

O primeiro a conseguir resultados animadores com a transferência nuclear foi Willadsen (1986), um marco no desenvolvimento da clonagem em mamíferos. Foram utilizados oócitos de ovelhas maturados *in vivo* e o resultado culminou com nascimento de três cordeiros a partir do núcleo de embriões. Após esses resultados, com o método utilizando células embrionárias como doadoras de núcleo foram obtidos nascimentos de clones bovinos (PRATHER et al., 1987) e suínos (PRATHER; SIMS; FIRST, 1989).

Smith et al. (1988) provaram que mesmo núcleos advindos de células do botão embrionário de embriões em fase de blastocisto mantinham o potencial para reiniciar o desenvolvimento embrionário. Assim, a utilização dessas células garantiria uma fonte ilimitada para produção de clones, fazendo com que pesquisadores como Campbell et al. (2007) confirmassem que núcleos derivados de linhagens celulares embrionárias teriam capacidade de sustentar o desenvolvimento a termo, ou seja, mesmo que as células que estivessem completamente diferenciadas, poderiam ser utilizadas na TN (BORDIGNON e SMITH, 2002).

Em 1996 na Escócia, após os estudos de clonagem e mamíferos superiores, nasceram as ovelhas Megan e Morag (CAMPBELL, 1996) a partir de uma célula embrionária em G0 (repouso) por redução dos níveis energéticos dos meios de cultivo celular. Entretanto, resultados também mostraram que a obtenção de animais clonados mediante a técnica de transferência nuclear sem levar o núcleo ao estado quiescente, não é imprescindível para que se ative o desenvolvimento embrionário (WAKAYAMA et al., 1999).

O nascimento da ovelha Dolly (que este ano completaria 26 anos), a partir de uma célula somática diferenciada, e não de células embrionárias em desenvolvimento, demonstrando que células somáticas especializadas, podem ser reprogramadas após sua fusão com um oócito enucleado, passando pelo desenvolvimento embrionário e originando um animal com a mesma informação genética do animal doador da célula somática (RECUERDA, 2011).

As células somáticas foram cultivadas *in vitro*, e posteriormente conservadas durante cinco dias num meio pobre em soro fetal para levar o ciclo celular ao estado quiescente (De MIGUEL, 2008). Cada célula somática foi introduzida em um oócito em metáfase II enucleado, A célula somática foi introduzida no espaço perivitelino, houve a fusão das membranas plasmáticas da célula doadora de núcleo e o citoplasto por estímulos elétricos. Após estimulação elétrica, desenvolvimento embrionário em meio de cultivo e, posterior transferência intrauterina na ovelha receptora, nasceu Dolly, o primeiro mamífero obtido de uma célula somática de um animal adulto (WILMUT et al., 1997).

Em 1998, Dolly pariu Bonie e com a gestação e o parto normais, demonstrou-se que animais obtidos por transferência nuclear podem se reproduzir normalmente. A TNCS também foi relatada em bovinos (KATO et al., 1998), suínos (BETHAUSER et al., 2000), equinos (GALLI et al., 2003), camundongos (WAKAYAMA et al., 1998), caprinos (BAGUISI et al., 1999), cães (LEE et al., 2005), gatos (SHIN et al., 2002) e bubalinos (SHIN et al., 2007).

No Brasil, em 2001, nasceu o primeiro animal produzido por TN na América Latina, Vitória, uma bezerra Simental. Resultado do experimento da Embrapa Cenargen, em que se utilizaram células embrionárias e citoplasma de ovócitos pré-ativados com enucleação em telófase II. Em 2002, na Fazenda Panorama (Monte-Mor, SP), nasceu o Marcolino da USP, o primeiro clone a partir de fibroblasto fetal. O clone brasileiro gerado a partir de célula diferenciada adulta foi chamado de Penta, nascido em julho de 2002 em Jaboticabal-SP. Em 2003, nasceu Bela da USP, uma bezerra Nelore também obtida por TN de célula diferenciada adulta, e Lenda, uma bezerra da raça holandesa clonada a partir de células da granulosa de um ovócito retirado do ovário de uma vaca morta. Com objetivo de fazer uma TN de um animal clone, foi produzida a Vitoriosa da Embrapa, primeiro clone do clone da América Latina (MELLO, 2003; MEIRELLES et al., 2007; RODRIGUES e RODRIGUES, 2009; RUBIN et al., 2009; NEVES et al., 2010; TRECENTI e ZAPPA, 2013).

Foi demonstrado, assim, que a geração de animais viáveis por meio da TN, utilizando núcleo de células somáticas diferenciadas de mamíferos pode

ser reprogramado quando transferido a um oócito enucleado (BRAGA e FRANCO, 2013).

1.2 Transferência Nuclear com Células Somáticas

1.2.1 Célula Doadora e Célula Receptora

1.2.1.1 Células somáticas como doadoras de núcleo

O sucesso da TNCS depende, em parte, dos tipos de células doadoras. As células somáticas de diferentes tecidos têm origens genéticas e epigenéticas distintas, e isso afeta os processos de reprogramação nos genomas dos embriões oriundos de TNCS e suas eficiências de clonagem. Como células doadoras, as células do cumulus e fibroblastos da pele da orelha são as mais utilizadas na TNCS devido à disponibilidade e manutenção em cultivo *in vitro*, além de apresentarem maior eficiência na clonagem e menores anomalias nos animais clonados (WELLS et al., 1999; KATO; TANI; TSUNODA, 2000; PANDEY et al., 2010; LIU et al., 2013).

Tem-se buscado explicações para as possíveis causas de alterações na reprogramação epigenética debatendo a eficácia da TNCS (WILMUT, 2002). O estado epigenético global de uma determinada célula é determinado por interações tridimensionais de modificadores epigenéticos e é o resultado de uma expressão equilibrada de conjuntos de “escritores” e “apagadores”. É possível, segundo Min et al (2015), que os blastocistos provenientes de TNCS utilizando fibroblastos como células doadoras de núcleo, manteriam estados epigenéticos mais errôneos (ou seja, menos reprogramados) do que células do cumulus e, portanto, manteriam um menor potencial de desenvolvimento.

Yang et al. (2004) mostraram que embriões TNCS autólogos resultaram em maiores taxas de desenvolvimento in *vitro* e *in vivo* em comparação com embriões TNCS heterólogos (célula doadora não relacionada ao citoplasma receptor). Na TNCS, a fusão elétrica das células doadoras com oócitos receptores enucleados contém uma grande quantidade de citoplasma estranho. Sendo assim, existe a possibilidade de se produzir embriões clonados

utilizando oócitos e células somáticas derivadas da mesma fêmea, a fim de evitar a contribuição citoplasmática de oócitos estranhos (TNCS autólogo), não apresentando heteroplasmia. Essa diferença pode ser a influência individual de doadoras de oócitos. Já que a doadora de oócito influencia a produção de blastocistos tanto na FIV bovina quanto na TNCS.

A eficiência e a capacidade do oócito em reprogramar o núcleo doador e resultar em um desenvolvimento bem-sucedido é fortemente influenciada pelo tipo de célula doadora (KATO; TANI; TSUNODA, 2000; MEISSNER e JAENISCH, 2006). Os núcleos de células menos diferenciados suportam melhor desenvolvimento a termo em comparação com os de células totalmente diferenciadas. Já as células mais diferenciadas sofrem modificações de origem epigenética em suas estruturas celulares que restringem sua reprogramabilidade pelos oócitos. Assim, o estado epigenético de um núcleo doador restringe a capacidade dos oócitos de reprogramar completamente o genoma após a TNCS (ALBERIO; CAMPBELL; JOHNSON, 2006).

Em camundongos, células doadoras nas fases G1, G2 e M, são compatíveis com uma clonagem bem-sucedida, enquanto que a fase S as taxas de clivagem são baixas (OGURA et al., 2000; EGGAN et al., 2001).

Vários métodos têm sido usados para sincronizar o ciclo celular, entre eles, a adição de mimosina, (alcalóide que interrompe as células no final da fase G1) (SADEGHIAN-NODOUSHAN et al., 2014), a roscovitina, (inibidor de aminopurina de CDK1/ciclina B, CDK2 e CDK5, que sincroniza as células em G0/G1) e a lovastatina é um medicamento que prende as células em G1(DAVIS; HO; STEVEN; 2001). Esses produtos químicos podem gerar toxicidade e, em algumas linhagens celulares, provocar apoptose. Portanto, alternativas, como a restrição de soro (GOTO et al., 2013), que atua nas células fazendo com que permaneçam em G0 e suspendam a transcrição, e alta confluência celular que causa inibição do ciclo por contato célula a célula (GERGER et al., 2010). Além do tratamento com o agente desregulador de microtúbulos, o nocodazol (AMANO et al., 2001).

1.2.1.2 Células tronco como doadoras de núcleo

A célula-tronco é considerada uma unidade funcional da embriogênese devido à sua capacidade de autorrenovação, gerando diversos tipos celulares diferenciados e regeneração de tecidos adultos. As células-tronco podem ser divididas em dois tipos, embrionárias e adultas. As linhagens de células tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna (ICM) de embriões no estágio de blastocisto e podem ser cultivadas *in vitro* sem se tornarem aneuploidias. Elas exibem pluripotência de desenvolvimento (AGUILA et al., 2022).

Como as populações de células que se dividem rapidamente são assíncronas, alguns pesquisadores usam o tamanho da célula como critério para o doador de núcleo. As células pequenas foram consideradas na fase G1, enquanto as grandes foram consideradas na fase G2/M. De acordo com Zhou et al. (2001) números significativamente maiores de núcleos M2 evoluíram para o estágio de blastocisto do que os núcleos interfásicos. Alguns estudos descobriram que a heterozigosidade do genoma da célula doadora é uma questão importante na sobrevivência pós-natal. Outro ponto a ser considerado é sobre as condições de cultivo das células é que a confluência celular das células tronco afeta drasticamente o potencial de desenvolvimento dos embriões. O número de passagem de células pode afetar a capacidade das células células tronco de se agregarem e dar origem a descendentes viáveis (GAO et al., 2003).

1.2.1.3 Células receptoras de núcleo

Os oócitos podem ser provenientes da aspiração folicular de ovários de abatedouros ou obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassom de fêmeas pré-selecionadas. Os oócitos são maturados *in vitro* e após a extrusão do primeiro corpúsculo polar fica confirmada a maturação dos mesmos (BRESSAN et al., 2008).

A fim de se obter o sucesso da técnica de TN, a fonte e a qualidade dos citoplastos representam fatores cruciais e com essa visão, vários estudos mostram que o estádio nuclear adequado deste citoplasto receptor é que

oócitos em metáfase II (MII) são mais adequados para suportar a reprogramação nuclear (ZHOU et al., 2001; LEE et al., 2007).

Os oócitos maturados *in vitro* têm sido muito utilizados devido à disponibilidade de ovários oriundos de abatedouros, resultando em baixo custo e alta disponibilidade destas células. Além disso, possibilita um maior controle dos estádios da maturação (PEREIRA e FREITAS, 2009).

O material nuclear deve ser removido, aspirando a placa metafásica dos oócitos em MII juntamente com o corpúsculo polar. Esse processo é conduzido utilizando-se micropipetas acopladas a micromanipuladores restando apenas no seu conteúdo citoplasmático como citoplastos receptores (LI et al., 2004).

Em espécies como a bovina, o conteúdo nuclear dos oócitos em MII é marcado com Hoechst 33342, antes do processo de enucleação. (VELILLA et al., 2002). A citocalasina B também tem sido utilizada junto com o Hoechst 33342 despolarizando os microfilamentos e impedindo a citocinese (SÁ et al., 2006).

1.3 Desenvolvimento *in vitro* de embriões derivados de TNCS

Os processos de diferenciação que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário são controlados por padrões temporais e espaciais de expressão gênica. Em embriões reconstruídos por TN, o material genético do doador deve responder ao ambiente citoplasmático e retomar o processo normal de desenvolvimento. Os mRNAs e as proteínas adquiridos pelo oócito durante seu crescimento e maturação final permitem que o zigoto passe pelos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário até o momento em que o embrião produz esses fatores por conta própria, a chamada transição materno-zigótica (TMZ). O início da TMZ é dependente da espécie. A TMZ é considerada uma etapa importante e limitante do desenvolvimento porque coincide com um bloqueio de desenvolvimento observado em embriões cultivados *in vitro* (TELFORD; WATSON; SCHULTZ, 1990; KANKA, 2003).

De acordo com Brambrink et al.(2006), o perfil de transcrição das células tonco derivadas de embriões resultantes de uma fertilização natural ou TNCS são idênticos, e tem sido sugerido que apenas núcleos que sofreram

reprogramação epigenética adequada são capazes de gerar células tronco a partir de embriões TNCS. Além disso, o desenvolvimento completo de embriões de mamíferos também requer uma organização espacial das células e falhas nesses eventos podem levar a anormalidades no desenvolvimento. Um dos primeiros eventos espaciais durante o desenvolvimento embrionário é a formação do trofoectoderma (TE) que dá origem a estruturas extraembrionárias; pode ser o principal impedimento para a geração de animais adultos a partir do TNCS (ALBERIO; CAMPBELL; JOHNSON, 2006).

1.4 Problemas relacionados à clonagem

O genoma embrionário em bovinos torna-se transcricionalmente ativo com 8-16 células devido aos fatores de transcrição de origem materna expressos, acumulados e armazenados no citoplasma do oócito (HU et al., 2010).

Na TNCS há uma reprogramação incompleta em embriões causando a interrupção do crescimento em vários estágios de desenvolvimento e produzindo fenótipos anômalos (HILL et al., 2000; ONO et al. 2001). Erros de reprogramação produzem perfis defeituosos de expressão gênica e o acúmulo desses erros dificulta o desenvolvimento normal dos embriões (HUMPHERYS et al. 2001).

Nos mamíferos, os problemas relacionados à placenta são os mais comuns em embriões derivados de TNCS. Anormalidades comumente observadas incluem: expectativa de vida mais curta, placenta aumentada, obesidade, problemas respiratórios e síndrome da prole grande. A taxa de sobrevivência dos blastocistos clonados até o nascimento de uma prole viável e saudável permanece em um nível semelhante e baixo, em comparação com uma taxa de natalidade de 30% a 60% para blastocistos fertilizados *in vitro* e anormalidades fisiológicas e de desenvolvimento foram observadas em uma proporção significativa dos fetos obtidos (MALIN; WITKOWSKA-PILASZEWICZ; PAPIS, 2022). .

Como muitas dessas anormalidades não são herdadas, acredita-se que não sejam causadas por deficiências na replicação cromossômica, mas sim por

uma falha em reprogramar características epigenéticas de células somáticas, especialmente genes imprintados. Durante o desenvolvimento de organismos multicelulares, diferentes células e tecidos adquirem diferentes programas de expressão gênica. É regulado por modificações epigenéticas, como metilação do DNA, modificações da cauda de histonas e proteínas não histonas que se ligam à cromatina (BIRD, 2002).

Assim, cada tipo de célula tem sua própria assinatura epigenética que reflete o genótipo, e as influências ambientais e, em última análise, se reflete no fenótipo da célula e do organismo. Para a maioria dos tipos de células, essas marcas epigenéticas tornam-se fixas quando as células se diferenciam ou saem do ciclo celular. Para a transferência nuclear bem-sucedida e o desenvolvimento do embrião resultante, o estágio nuclear do núcleo doador deve se tornar semelhante ao de um núcleo zigótico normal. O núcleo doador deve adotar os parâmetros do ciclo celular do zigoto, incluindo replicação do DNA, quebra do envelope nuclear, condensação e segregação cromossômica e, subsequentemente, padrões embrionários de replicação e transcrição do DNA. O citoplasma do oócito receptor tem que direcionar essa reprogramação do núcleo doador. Na TNCS, a reprogramação difere marcadamente entre os diferentes tipos de células doadoras (BEYHAN et al. 2007; FUKUDA et al. 2010).

A falha em alcançar o desenvolvimento a termo tem sido geralmente atribuída a uma série de razões, como limitações técnicas na reconstrução do embrião, o uso de oócitos incompetentes ou de baixa qualidade e a falta de sincronização do ciclo celular entre as células doadoras e receptoras (ALBERIO; CAMPBELL; JOHNSON, 2006). Os fatores de reprogramação são dominantes e que quando uma célula menos diferenciada é fundida com uma mais diferenciada, o fenótipo resultante é o da menos diferenciada (CIBELLI et al., 2006).

A reprogramação nuclear após o TNCS pode ser dividida em dois grandes eventos. A primeira é uma reversão do programa de pluripotência e o segundo passo é o estabelecimento de novos programas de diferenciação. O primeiro evento leva à reativação oportuna de um programa zigótico, envolvendo a reativação correta dos genes embronários e repressão de genes

somáticos. O segundo evento é o início do programa de diferenciação que começa quando o trofoectoderma (TE) surge como a primeira linhagem no embrião (WAKAYAMA, 2007).

Em se tratando de expressão gênica, o fator de transcrição de ligação ao octâmero 4 (Oct-4) tem sido usado como marcador de reprogramação em muitos estudos que usam células tronco ou oócitos como ambiente de reprogramação. Outro gene chamado Nanog (um homeobox contendo fator de transcrição) também foi descrito como um fabricante do processo de reprogramação nuclear, essencial para a manutenção da pluripotência e autorrenovação (CHAMBERS et al., 2003).

Avaliando as linhagens TE e MCI utilizando Cdx2 (um homeobox 2 do tipo caudal) e Oct-4 que são genes-chave para a especificação de TE e ICM, respectivamente. Blastocistos expressando Oct-4 são inferiores a 50%; no entanto, independentemente da expressão de Oct-4, mais de 90% dos embriões clonados expressaram Cdx2, sugerindo que esses embriões têm um potencial reduzido para produzir a linhagem MCI, a linhagem TE pode ser estabelecida e mantida (WAKAYAMA, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da fonte oocitária, a partir da coleta de oócitos (OPU) de animais vivos ou post-mortem sobre os índices de produção e qualidade de embriões bovinos submetidos à nuclear com células somáticas transferência.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar as taxas de clivagem e blastocistos TNCS produzidos a partir de oócitos coletados por aspiração folicular guiada por ultrassom;

Avaliar as taxas de apoptose em blastocistos TNCS provenientes de oócitos por punção folicular guiada por ultrassom.

3. METODOLOGIA

O experimento avaliou o potencial de oócitos recuperados por OPU de vacas (n=5) maduras (3-6 anos) com atividade cíclica luteal e escore de condição corporal de 3,0 a 4,0 (grupo TNCS-OPU) ou de ovários obtidos post-mortem em abatedouro de vacas desconhecidas (grupo TNCS-Abatedouro) para serem utilizadas como doadoras de citoplasma para TNCS.

A OPU foi realizada quatro vezes por vaca doadora de oócitos, com três semanas de intervalo. Taxas de clivagem e blastocistos, número total de células e índice de apoptose foram comparados entre os grupos. Embriões partenogenéticos (grupo Partenogenéticos) e fertilizados *in vitro* (grupo FIV) foram utilizados como controle e foram derivados de oócitos coletados no abatedouro.

3.1 Maturação *in vitro* (MIV)

A maturação foi realizada em meio de cultura de tecidos (TCM-199; Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 20 µg/mL-1 de FSH (Pluset, Callier, Barcelona, Espanha), piruvato de sódio 0,36 mM, bicarbonato de sódio 10 mM e 50 mg/mL-1 de estreptomicina-penicilina e 10% de soro de vaca em estro em atmosfera umidificada de 5% CO2 a 38,5ºC por 18 h para TNCS (grupos TNCS-OPU e TNCS-Abatedouro) ou 22 h para fertilização *in vitro* ou partenogênese.

3.2 Fertilização *in vitro* (FIV)

Oócitos maturados *in vitro* foram fertilizados com espermatozoides de touro Gir (Bos indicus). O sêmen foi descongelado a 37 ºC e centrifugado a 9000 X g por 5 min em um gradiente de densidade descontínua de Percoll (45-90%) para a obtenção de espermatozoides móveis. O pellet foi centrifugado novamente a 9000 X g por 3 min em meio Fert-TALP. A fertilização *in vitro* foi realizada em gotas de 100 µL de Fert-TALP suplementado com 2 x 10^6 espermatozoides/mL, 20 µg/mL de heparina e 6 mg/mL de fração V BSA livre

de ácidos graxos, cobertas com óleo mineral, por 22 h em atmosfera umidificada de 5% CO2 e 38,8 ºC no ar.

3.3 Cultura de células doadoras

A linhagem celular foi derivada de uma biópsia de pele da orelha de uma vaca Gir e depositada em um banco de células congeladas. O banco de células é composto por culturas primárias de fibroblastos passadas pelo menos três vezes antes de serem congeladas com 10% de DMSO e 10% de SFB em meio DMEM. Para o presente estudo, os fibroblastos foram descongelados, deixados crescer até 90-100% de confluência em 10% SFB em meio DMEM e depois passados para uso como doadores nucleares. Células de quatro a seis passagens foram usadas como doadoras de núcleo para TNCS.

3.4 Transferência nuclear com células somáticas e ativação do oócito

Oócitos maturados *in vitro* foram desnudados com hialuronidase a 0,1% e aqueles com corpo polar visível foram expostos a 5 µg/mL de Hoechst 33342 e 5 µg/mL de citocalasina B. Manipulações para enucleação e reconstrução foram realizadas com TALP HEPES. Os embriões foram reconstruídos com células somáticas de vaca Gir adulta, fundidas com pulso elétrico duplo de 2,4 kV/cm por 30 µs. A ativação do oócito e a partenogênese foram induzidas pela exposição a 4,8 µM de ionomicina por 5 min seguido de 2 mM de 6-DMAP por 4h.

3.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

Os prováveis zigotos desnudados foram cultivados em meio CR2aa modificado com 2,5% FCS (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) sob 5% CO_2, 5% O_2 e 90% N_2 a 39ºC em alta umidade por 168 h pós-inseminação/ativação (hpi). A taxa de clivagem foi avaliada em 72 hpi e a taxa de blastocisto em 168 hpi.

3.6 Ensaios de apoptose e número total de células de blastocistos

Blastocistos em 168 hpi foram submetidos à marcação terminal de dUTP-digoxigenina nick end-labelling (TUNEL) mediada por deoxinucleotidil transferase mediada por desoxinucleotidil (TUNEL) usando um kit comercialmente disponível (Dead End Fluorimetric TUNEL System, Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, os embriões (n=39) foram fixados em paraformaldeído 4% a 4°C e então permeabilizados com Triton X-100 0,2% (Promega), ambos em DPBS (Nutricell). Os embriões de controle positivo foram previamente tratados com DNase (Promega). Após a permeabilização, as amostras de controle positivo e alvo foram incubadas em gotas de 100 µL com mistura de reagentes contendo solução enzimática (enzima desoxinucleotidil transferase terminal) e solução de coloração a 90% (conjugado de fluoresceína dUTP) por 1 h a 37 °C em uma câmara úmida escura. Os embriões de controle negativo foram incubados apenas na solução de coloração sem solução enzimática. Em seguida, os embriões foram corados com Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) mais 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e montados em lâminas para avaliação por microscopia de fluorescência. O número total de células e o número de células apoptóticas por embrião foram contados e o índice de células apoptóticas foi calculado como a razão de células apoptóticas/número total de células.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de fusão, clivagem e taxa de blastocisto de quatro réplicas foram analisados pelo teste Qui-quadrado. Os dados de número total de células, número de células apoptóticas e índice de células apoptóticas foram avaliados por análise de variância e diferenças entre médias comparadas por Student Newman-Keuls (SNK). Os dados de número total de células, número de células apoptóticas, índice de células apoptóticas e valores de expressão relativa são apresentados como média ± SEM e clivagem e blastocistos como

proporção do total dos embriões cultivados. Um valor de P < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Produção de embriões por TNCS

A taxa de desenvolvimento de blastocistos é um importante parâmetro para avaliação do desenvolvimento embrionário pré-implantação. O citoplasma dos oócitos derivados da OPU (grupo TNCS-OPU) produziu taxas de fusão, clivagem e blastocistos semelhantes (P > 0,05) após reconstrução com células somáticas do que aquelas dos oócitos obtidos de ovários recuperados post-mortem em abatedouro comercial (TNCS-Abatedouro grupo). O desenvolvimento dos embriões partenogenéticos também foi semelhante (P > 0,05) aos embriões dos grupos TNCS-OPU e TNCS-Abatedouro. No entanto, as taxa de clivagem e de blastocistos de embriões FIV foram menores (P < 0,05) do que embriões TNCS reconstruídos com citoplasma de oócitos dos grupos OPU e Abatedouro (Tabela 1).

Tabela 1. Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos TNCS derivados de oócitos OPU (grupo TNCS-OPU) ou de oócitos obtidos de ovários recuperados a partir de ovários recuperados de vacas desconhecidas *post mortem* em abatedouro (grupo TNCS-Abatedouro).

Grupos	Nº. por fusão[1]	Taxa de fusão (n)	Nº. de zigotos cultivados[2]	Taxa de clivagem (n)	Taxa de blastocistos (n)
TNCS-OPU	100	71.0% (71)[a]	71	74.6% (53)[a]	32.4% (23)[a]
TNCS-Abatedouro	120	68.3% (82)[a]	82	69.5% (57)[a]	25.6% (21)[a]
Partenogenéticos			124	64.5% (80)[ab]	20.9% (26)[a]
Fertilizados *in vitro*			176	53.9% (95)[b]	12.5% (22)[b]

Média com letras diferentes superescritas na mesma coluna diferem (*P*<0,05). Oócitos dos grupos fertilização *in vitro* e partenogenéticos foram derivados do Abatedouro.
TNCS: Transferência Nuclear de Células Somáticas. Resultado de pelo menos 4 réplicas.
[1]Número de citoplasmas de oócitos por fusão.
[2]Número de estruturas em cultivo

5.2 Apoptose e número total de células de blastocistos TNCS

Blastocistos de células somáticas transferidos de núcleos do grupo TNCS-Abatedouro apresentaram índice apoptótico maior (P < 0,05) do que os de FIV, enquanto que não houve diferença (P > 0,05) entre os grupos TNCS-OPU e FIV (Tabela 2). Nenhuma diferença (P > 0,05) foi encontrada para o número total de células nos blastocistos dos grupos TNCS-OPU, TNCS-Abatedouro, Partenogenéticos e Fertilizados *in vitro*, enquanto que o número de células apoptóticas foi menor (P < 0,05) nos blastocistos FIV do que nos do grupo Partenogenéticos.

Tabela 2. Número total de células e células apoptóticas de blastocistos derivados de oócitos OPU (grupo TNCS-OPU) ou de oócitos obtidos de ovários de abatedouros provenientes de vacas desconhecidas (grupo TNCS-Abatedouro).

Grupo	No.[1]	Número total de células	Número de células apoptóticas	Índice Apoptótico
TNCS-OPU	9	80,66±5,36[a]	12,66±3,25[ab]	0,15±0,03[ab]
TNCS-Abatedouro	10	82,10±4,79[a]	15,60±3,04[ab]	0,20±0,04[a]
Partenogenéticos	10	102,60±9,63[a]	18,50±7,63[a]	0,19±0,03[a]
Fertilizados *in vitro*	10	107,80±12,35[a]	7,40±0,93[b]	0,07±0,00[b]

Médias com diferentes letras sobrescritos na mesma coluna diferem (P<0,05), TNCS: transferência nuclear de células somáticas, Resultados de três réplicas, [1]Número de embriões.

No presente estudo, os blastocistos de FIV foram utilizados como controle. Foi demonstrado que blastocistos TNSC derivados de oócitos OPU apresentaram proporção semelhante de células apoptóticas a blastocistos de FIV, em contraste com blastocistos TNCS derivados de oócitos recuperados de matadouro. Isso sugere que blastocistos TNCS derivados de OPU podem ter qualidade mais semelhante aos blastocistos de FIV do que aqueles derivados de oócitos recuperados em abatedouro. Os embriões dos quatro grupos que foram submetidos ao TUNEL estão representados na figura 2.

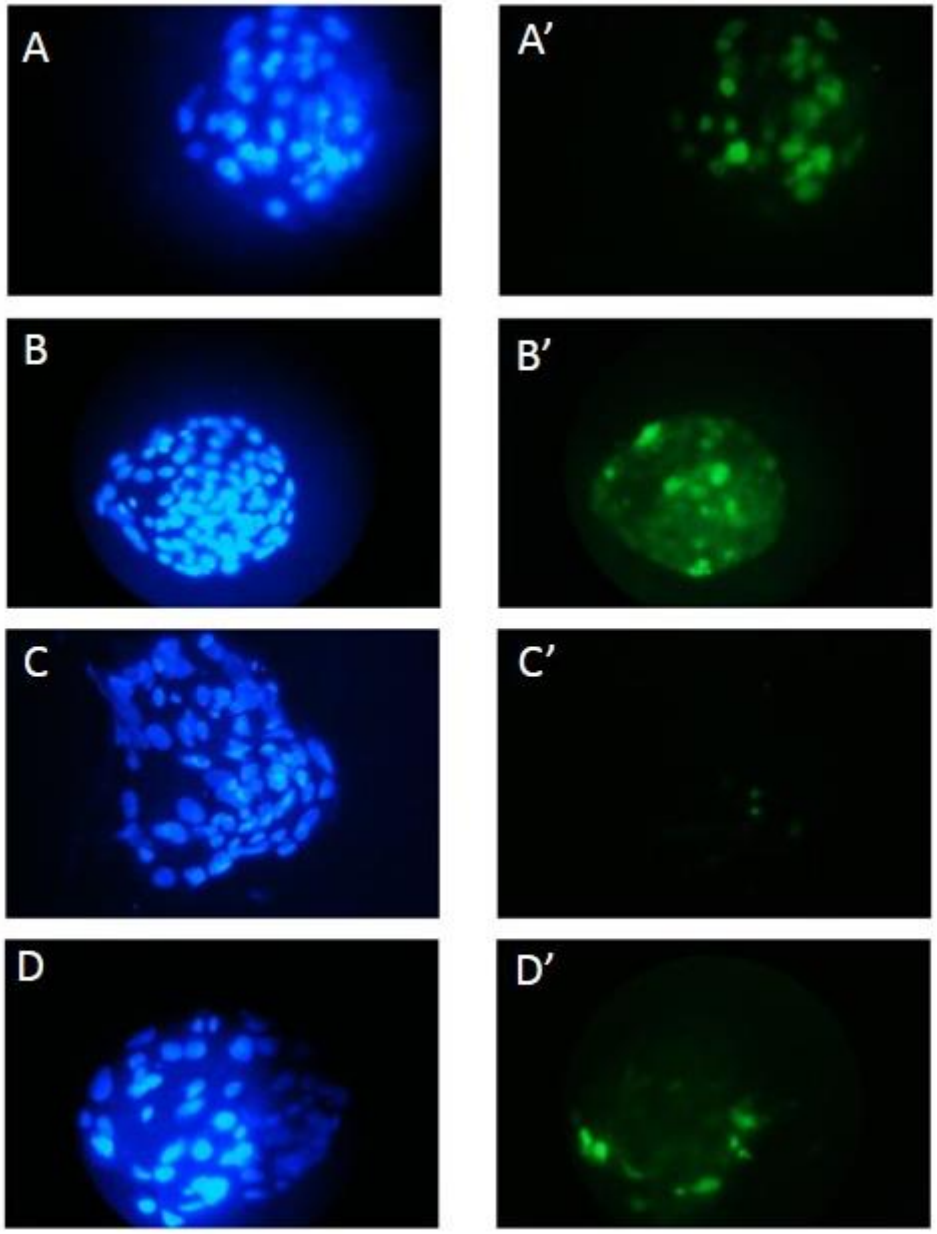

Figura 2: Imagens dos embriões referentes aos quatro tratamentos: A (TNCS-OPU), B (TNCS-Abatedouro), C (Partenogenéticos) e D (Fertilizados *in vitro*). As fotos são em duplas com DAPI (azul) e com fluoresceína (verde) do mesmo embrião.

Os blastocistos TNCS derivados de oócitos recuperados post-mortem apresentaram uma proporção maior de células apoptóticas do que blastocistos de FIV, em contraste com blastocistos TNCS derivados de OPU. Apesar disso, o uso de citoplasma de oócitos derivados de matadouro ou OPU resultou na produção de blastocistos TNCS em taxa semelhante.

6 DISCUSSÃO

Em laboratórios que realizam TNCS, os ovários geralmente são recuperados em abatedouros comerciais devido à sua disponibilidade e o baixo custo. No entanto, os estados reprodutivo e nutricional dos animais abatidos são, geralmente, desconhecidos. Os animais abatidos podem apresentar problemas de fertilidade, e/ou desnutrição, e sob condições de estresse, os oócitos recuperados têm grande chance de apresentar baixa capacidade de desenvolvimento, prejudicando a produção e/ou qualidade do blastocisto, e, consequentemente, baixa eficiência do TNCS. A técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom transvaginal (OPU) permitiu a recuperação de oócitos de doadoras vivas, em que é possível o controle de variação relacionada à fisiologia ovariana demonstrou afetar os resultados da produção de embriões *in vitro* (MACHATKOVA et al., 2004).

A procedência de oócitos recuperados de ovários de abatedouros é desconhecida, levando-se em consideração que a clonagem depende amplamente da qualidade do oócito a ser utilizado. Quando se utiliza oócitos OPU, sua origem é conhecida e maior é a chance de oócitos de melhor qualidade darem origem a clones com menos problemas. Assim, a recuperação de oócitos *in vivo* por OPU também pode ser uma estratégia para aumentar a qualidade dos blastocistos do TNCS. Além disso, permite a utilização de animais da mesma raça ou linhagem do doador de células. Essa possibilidade é particularmente interessante para algumas raças em que a associação de criadores só permitirá o registro de um bezerro clonado se o embrião for reconstruído com citoplasma de oócitos da mesma raça do doador da célula, como ocorre para o zebu brasileiro.

A taxa de clivagem e blastocistos no grupo de fertilização *in vitro* foram inferiores aos grupos SCNT-OPU, TNSC-Abatedouro. A diferença entre fertilização e ativação química utilizada para SCNT e para partenogênese pode ser devido à capacidade de espermatozóides em ativar o oócito. Sabe-se que o touro é uma fonte comum de variação na taxa de penetração, na ativação de oócitos e na produção de embriões (ZHANG et al., 1997; CAMARGO et al., 2002), enquanto os produtos químicos usados para ativação são bem-

sucedidos na penetração do oócito e podem produzir embrião tanto quanto a fertilização *in vitro* (WANG et al., 2008). No presente estudo foi utilizado sêmen empregado comercialmente para inseminação artificial, dessa forma, é possível que a baixa taxa de clivagem seja devido a uma baixa capacidade de seu esperma de fertilizar o oócito em condições *in vitro*, resultando também em baixa taxa de blastocisto.

A importância da apoptose durante o desenvolvimento do embrião para eliminar blastômeros com células anormais e prejudiciais, porém, uma maior incidência pode comprometer a qualidade do embrião (HARDY, 1997; BRISON e SCHULTZ, 1997).

A produção de animais clonados é um processo ineficiente devido às perdas embrionárias precoces ou tardias. Avaliando a fragmentação do DNA que ocorre durante o desenvolvimento embrionário em embriões bovinos produzidos por FIV e por TNCS, a fragmentação do DNA pode ser detectada pela primeira vez em embriões TN no estágio de quatro células, mas em embriões FIV no estágio de seis a oito células. O índice de núcleo fragmentado de DNA em embriões TN que se desenvolveram além do estágio de quatro células é significativamente maior do que em embriões FIV no mesmo estágio e principalmente na massa celular interna (MCI). O índice de núcleo fragmentado de DNA correlaciona-se negativamente com o número total de células em blastocistos TN, mas essa relação não foi observada em blastocistos de FIV, segundo Fahrudin et al. (2002). Esses resultados sugerem que a alta ocorrência de fragmentação de DNA observada em embriões TN pode estar relacionada à perda embrionária precoce e a baixas taxas de natalidade após a transferência.

A cultura em longo prazo de células doadoras também pode aumenta a incidência de apoptose em embriões bovinos TNSC, mas não afeta a competência de desenvolvimento e o número de células de blastocistos (JANG et al., 2004). Células somáticas cultivadas em longo prazo sofrem senescência celular e apresentam numerosas mutações ou perda alélica de genes acumulados através de muitas rodadas de divisões celulares, que são conhecidas por causar reprogramação genética imprópria após TNSC e subsequente desenvolvimento anormal dos embriões (JANG et al., 2013).

A propensão à apoptose é continuamente contrabalançada na célula por genes estimulando a sobrevivência e proliferação celular. Na indução por um gatilho apropriado, a célula ativa ou interrompe a repressão de produtos gênicos responsáveis pelo controle do mecanismo suicida (RAFF, 1992). Os genes estão envolvidos na morte celular (BAX) e na sobrevivência celular (Bcl-2) (YANG e RAJAMAHENDRAN, 2002). No presente experimento não foi feito estudo sobre a expressão gênica nos embriões para confirmar essa afirmação, porém sabe-se que pode haver diferença na abundância de transcritos de genes armazenados em oócitos MIV obtidos por OPU e oócitos de ovários recuperados post-mortem no matadouro e isso pode influenciar a qualidade dos embriões (CAETANO et al., 2022).

7 CONCLUSÕES

Apesar de a fonte de oócito para a utilização na transferência nuclear por células somáticas não impactar na produção de blastocistos, a apoptose embrionária pode afetar na sua produção.

8. REFERÊNCIAS

AGUILA, L.; OSYCKA-SALUT, C.; TREULEN, F. et al. Pluripotent core in bovine embryos: a review. **Animals**, v.12, p.1-10, 2022.

AKAGI, S.; ADACHI, N.; MATSUKAWA, K. et al. Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos and postnatal survival rate of cloned calves produced by two different timings of fusion and activation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 66, p. 264- 272, 2003.

ALBERIO, R.; CAMPBELL, K. H.; JOHNSON, A. D. Reprogramming somatic cells into stem cells. **Reproduction**, v. 132, p. 709–720, 2006.

AMANO, T.; TANI, T.; KATO, Y. et al. Mouse cloned from embryonic stem (ES) cells synchronized in metaphase with nocodazole. **Journal of Experimental Zoology**, v. 289, p. 139–145, 2001.

BAGUISI, A.; BEHBOODI, E.; MELICAN, D. T. et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 456-461, 1999.

BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L. R. Advances in reproductive technologies in cattle from artificial insemination to cloning. Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 56, p. 184-94, 2009.

BETTHAUSER, J.; FORSBERG, E.; AUGENSTEIN, M.; CHILDS, L. et al. Production of cloned pigs from in vitro systems. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 1055-1059, 2000.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, p. 6–21. 2002.

BORDIGNON, V.; SMITH, L. C. **Clonagem animal por transferência nuclear**. *In*: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: Varela, p. 281-302, 2002.

BRAMBRINK, T.; HOCHEDLINGER, K.; BELL, G. et. Al. ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable. **PNSA**, v. 103, p. 933–938, 2006.

BRESSAN, F.; MIRANDA, M.; DE BEM, T. et al. Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 240- 250, 2008.

BRIGGS, R.; KING, T. “Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs´ eggs”, **PNAS**, v. 38, p. 455- 463. 1952.

BRISON, D. R.; SCHULTZ, R. M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. **Biology of Reproduction**, 56, p. 1088–1096, 1997.

BROMHALL J. “Nuclear transplantation in the rabbit egg”, **Nature**, v. 258, p. 719-722, 1975.

CAETANO, L. C; VERRUMA, C. G.; PINAFFI, F. L. V. et al. In vitro and in vivo matured bovine oocytes present a distinct pattern of single-cell gene expression. **Zygote**, v. 20, p.1-13, 2022.

CAMARGO, L. S. A; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M. et al. Effect of sperm concentration and incubation period of oocyte-spermatozoa on in vitro fertilization in Gir breed. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 37, p. 709-715, 2002.

CAMPBELL, K. H. S.; LOI, P.; OTAEGUI, P. J.; et al. Cell cycle coordination in embryo cloning by nuclear transfer. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 40-46, 1996.

CAMPBELL, K. H. S.; FISHER, P.; CHEN, W. C. et al. Somatic cell nuclear transfer: past, present, and future perspectives. **Theriogenology**, v. 68, p. 214-231, 2007.

CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v. 113, p. 643–55, 2003.

CIBELLI, J. B.; KOCABAS, A. M.; BEYHAN, Z.; ROSS PJ. Cellular reprogramming for the creation of patient-specific embryonic stem cells. **Stem Cell Reviews**, v. 2, p. 289–95, 2006.

DAVIS, P. K.; HO, A.; STEVEN, F. Biological Methods for Cell-Cycle Synchronization of Mammalian Cells. **BioTechniques**, v. 30, p. 1322-1331, 2001.

DE MIGUEL BERIAN I. **La clonación diez años después**, Comares, Granada, 2008.

EGGAN, K.; AKUTSU, H.; LORING, J. et al. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. **PNAS**, v. 98, p. 6209–6214, 2001.

FAHRUDIN, M.; OTOI, T.; KARJA, N. W. et al. Analysis of DNA fragmentation in bovine somatic nuclear transfer embryos using TUNEL. **Reproduction**, v. 124, p. 813–819, 2002.

GAO, S.; CHUNG, Y. G.; WILLIAMS, J. W. et al. Somatic cell-like features of cloned mouse embryos prepared with cultured myoblast nuclei. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 48–56, 2003.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G. et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599-616, 2003.

GALLI, C.; LAZZARI, G. The manipulation of gametes and embryos in farm animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.1-7, 2008.

GERGER, R. P.; RIBEIRO, E. S.; FORELL, F. et al. In vitro development of cloned bovine embryos produced by handmade cloning using somatic cells from distinct levels of cell culture confluence. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 295-302, 2010.

GOO JANG, EUL-SOONPARK, JONG-KICHO, et al. Preimplantational embryo development and incidence of blastomere apoptosis in bovine somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed with long-term cultured donor cells. **Theriogenology**, v. 62, p. 512-521, 2004.

GORDON, J. W.; SCANGOS, G. A.; PLOTKIN, D. J. et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **PNAS**, p. 77, v. 7380-4, 1980.

GOTO, Y.; HIRAYAMA, M.; TAKEDA, K. et al. Effect of synchronization of donor cells in early G1-phase using shake-off method on developmental potential of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. **Journal of Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 592-599, 2013.

GURDON, J. “The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles”, **Journal of embryology experimental morphology**, v. 10, p. 622- 640, 1962.

GURDON, J. ”The transplantation of nuclei between two species of Xenopus”, **Developmental Biology**, v. 5, p. 68-83, 1965.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Mollecular Human Reproduction**, v. 3, p. 919-925, 1997.

HEYMAN, Y.; RENARD, J. P. Cloning of domestic species. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 427-436, 1996.

HODGES, C. A.; STICE, S. L. Generation of bovine transgenics using somatic cell nuclear transfer. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p. 81, 2003.

HUMPHERYS, D.; EGGAN, K.; AKUTSU, H. et al. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. **Science**, v. 293, p. 95-97. 2001.

JANG, G.; PARK, E. S.; CHO, J. K. et al. Preimplantational embryo development and incidence of blastomere apoptosis in bovine somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed with long-term cultured donor cells. **Theriogenolog**y, v. 62, p. 512–21, 2004.

KANKA, J. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. **Theriogenology**, v. 59, p. 3–19. 2003.

KATO, Y.; TANI, T.; SOTOMARU, Y. et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science, v. 282, p. 2095-2098, 1998.

KATO, Y.; TANI, T.; TSUNODA, Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn, and fetal cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 231–237, 2000.

KUROME, M.; FUJIMURA, T.; MURAKAMI, H. et al. Comparison of electro-fusion and intracytoplasmic nuclear injection methods in pig cloning. **Cloning Stem Cells**, v. 5, p. 367-378, 2003.

LEE, B. C.; KIM, M. K.; JANG, G. et al. Dogs cloned from adult somatic cells. **Nature**, v. 436, p. 641, 2005.

LEE, S. L.; KUMAR, B. M.; KIM, J. G. et al. Cellular composition and viability of cloned bovine embryos using exogen-transfected somatic cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 44–52, 2007.

LI, G.; WHITE, K.; BUNCH, T. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. **Cloning Stem Cells**, v. 6, p. 5-13, 2004.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E. et al. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 61, p. 329-335, 2004.

MALIN, K.; WITKOWSKA-PILASZEWICZ, O.; PAPIS, K. The many problems of somatic cell cloning mammals. **Theriogenology**, v. 189, p. 246-254, 2022.

MEISSNER, A.; JAENISCH R. Mammalian nuclear transfer. **Developmental Dynamics**, v. 235, p. 2460 –2469, 2006.

MIGLINO, M. A. Clonagem animal e placentação. **Acta Scientiae Veterinariae**. Supl. 32, p. 75-78, 2004.

MOGOLLÓN-WALTERO, E. M.; BOURG-DE MELLO, M. R.; BURLA-DÍAS, A. J. Clonagem de embriões bovinos a partir de células somáticas. **ORINOQUIA** - Universidad de los Llanos - Villavicencio, Meta, Colombia. v. 18, p. 95-104, 2014.

NIEMANN, H.; HAHN, L. A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. **Reproduction in Domestic Animals**. v.47, p. 2–10, 2012.

OGURA, A.; INOUE, K.; TAKANO, K. et al. Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells. **Mollecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 55–59, 2000.

PEREIRA, A.; FREITAS, V. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 118-128, 2009.

PRATHER, R. S.; BARNES, F. L.; SIMS, M. M. et al. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 37, p. 859-866, 1987.

PRATHER, R. S.; SIMS, M. M.; FIRST, N. L. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 414-418, 1989.

RAFF, M. C. Social controls on cell survival and cell death. **Nature**, v. 356, p. 397–400, 1992.

RECUERDA VEGA C. **Seguridad alimentaria y alimentos procedentes de animales clonados por transferencia nuclear de células somáticas**: Aspectos científicos, éticos y jurídicos. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid (ISBN: 978-84-695-1010-0), facultad de Veterinaria. 2011.

SÁ, R.; SOUSA, M.; CREMADES, N. et al. Haploidização. **Revista Internacional de Andrología**, v. 4, p. 9-24, 2006.

SADEGHIAN-NODOUSHAN, F.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; DALMAN, A. et.al. Mimosine As Well As Serum Starvation Can Be Used for Cell Cycle Synchronization of Sheep Granulosa Cells. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014. Article ID 851736 | https://doi.org/10.1155/2014/851736

SARAIVA, N. Z. **Citoplastos receptores produzidos por diferentes técnicas de enucleação na transferência nuclear em bovinos**. 2010. 157 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo.

SMITH, R. C.; DWORKIN-RASTL, E.; DWORKIN, M. B. Expression of histone H1-like protein is restricted to early Xenopus development. **Genes & Development**, v. 2, p .1284–1295, 1988.

SPEEMANN, H. **Embryonic Development and Inductrion**. New Haven: Yale University Press, Conn., 1938.

TAMADA, H.; KIKYO, N. Nuclear reprogramming in mammalian somatic cell nuclear cloning. **Cytogenetic Genome Research**, v. 105, p. 285-291, 2004.

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

TIAN, X. C.; KUBOTA, C.; ENRIGHT, B. et al. Cloning animals by somatic cell nuclear transfer – biological factors. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.1-7, 2003.

VELILLA, E.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E. et al. Effect of Hoechst 33342 staining on developmental competence of prepubertal goat oocytes. **Zygote**, v. 10, p. 201-208, 2002.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C. F.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v. 394, p. 369–374, 1998.

WAKAYAMA, T.; RODRÍGUEZ, I.; PERRY, A. C. F. et al. “Mice cloned from embryonic stem cells”, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 14984-14989, 1999.

WAKAYAMA T. Production of cloned mice and ES cells from adult somatic cells by nuclear transfer: how to improve cloning efficiency? **Journal of Reproduction and Development**, p. 53, p. 13–26. 2007.

WALL, R. J. Transgenic Livestock: Progress and Prospects for the Future. **Theriogenology**, v. 45, p. 57-68, 1996.

WANG, Z. G.; WANG, W.; YU, S. D. et al. Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 292-301, 2008.

WARD, F.; ENRIGHT, B.; RIZOS, D. et al. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v. 57, p. 2105-2117, 2002.

WELLS, D. Animal clonning: problems and prospects. **Revue Scientifique et Technique**, v. 24, p. 251-264, 2005.

WILLADSEN, S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, v. 320, p. 63-65, 1986.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature,** v. 385 p. 810–813, 1997.

WILMUT, I. “Are there any normal cloned mammals?” **Nature Medicine**, v. 8, p. 215-216, 2002.

YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of bcl-2 and Bax Proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 70, p. 159–169, 2002.

ZHANG, B. R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.et al. Relationship between embryo development in vitro and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. **Theriogenology**, v. 48, p. 221-231, 1997.

ZHOU, Q.; JOUNEAU, A.; BROCHARD, V. et al. Developmental potential of mouse embryos reconstructed from metaphase embryonic stem cell nuclei. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 412–419, 2001.

ZHOU, X., XIN, J.; FAN, N. et al., Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. **Cellular and Molecular Life Science**, v.72, p. 1175–1184, 2015.

Processo: 23071.928459/2022-55 Documento: 0905693

Pâmela Santana Ferreira

Desenvolvimento de embriões clones bovinos reconstruídos com oócitos coletados de animais vivos ou *post-mortem*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Genética & Biotecnologia

Aprovada em 02 de setembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo - Orientador
Embrapa Gado de Leite

Drª Naiara Zoccal Saraiva
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 12/08/2022.

Documento assinado eletronicamente por **Luiz Sergio de Almeida Camargo**, **Usuário Externo**, em 08/09/2022, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Naiara Zoccal Saraiva**, **Usuário Externo**, em 08/09/2022, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Carlos Magno da Costa Maranduba**, **Professor(a)**, em 12/09/2022, às 10:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0905693** e o código CRC **11A5CBBC**.