



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**EFEITOS DO CULTIVO *IN VITRO* PROLONGADO, CRIOPRESERVAÇÃO E
USO DE AGENTES MODIFICADORES DE CROMATINA EM CÉLULAS DO
FLUIDO AMNIÓTICO E DO CORDÃO UMBILICAL DE FETOS BOVINOS
PARA USO NA TRANSFERÊNCIA NUCLEAR**

ELISA RIBEIRO DA CUNHA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL

**BRASÍLIA/DF
JULHO DE 2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**EFEITOS DO CULTIVO *IN VITRO* PROLONGADO, CRIOPRESERVAÇÃO E
USO DE AGENTES MODIFICADORES DE CROMATINA EM CÉLULAS DO
FLUIDO AMNIÓTICO E DO CORDÃO UMBILICAL DE FETOS BOVINOS
PARA USO NA TRANSFERÊNCIA NUCLEAR**

ELISA RIBEIRO DA CUNHA

Orientadora: Prof^a Dr^a Sônia Nair Bão

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação Biologia Animal
da Universidade de Brasília, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Biologia Animal**

**BRASÍLIA/DF
JULHO DE 2013**

*Aos meus pais, por acreditarem no meu potencial, pelo enorme incentivo e pela
oportunidade de concretizar esse sonho.
A minha sincera gratidão, dedico a vocês essa conquista.*

*"Pois desde a criação do mundo os atributos invisíveis de Deus,
seu eterno poder e sua natureza divina, têm sido vistos claramente,
sendo compreendidos por meio das coisas criadas"*

Romanos 1:20

Quanto mais eu estudo o livro da natureza, através da ciência,
mais eu percebo as digitais do Criador.
Mais e mais me maravilho.

AGRADECIMENTOS

A Deus toda honra, toda glória e todo mérito. A razão da minha vida, força, sabedoria e refúgio em todos os momentos.

Aos meus pais por me ensinarem o caminho em que devo andar. Ao meu pai, Obedes Junior, por despertar em mim a paixão pela veterinária. A minha mãe, Inez Cunha, meu porto seguro e exemplo de mulher virtuosa.

Aos meus irmãos pelo carinho e pelas risadas que são um alívio nos dias estressantes. Ao meu irmão, Timóteo, pela paciência ao me ensinar a editar tantas figuras. À minha irmã, Layla, pela cumplicidade, minha irmã de sangue e amiga por opção.

Ao meu namorado, Junior Cesar, por morar no meu caminho e fazer dele mais feliz.

Ao Dr. Carlos Frederico Martins por me conceder a oportunidade de executar esse trabalho, pelo exemplo de caráter, por me ensinar a não ter medo de arriscar na pesquisa, a buscar inovação e a não fazer só mais do mesmo. Obrigada pela confiança e amizade compartilhada nesses anos.

À minha orientadora, Dr^a. Sônia Nair Bão, pela disponibilidade em me orientar e auxiliar durante esse trabalho, pelas correções e cobranças, pelo exemplo de competência e dedicação.

À minha família pelas orações e pela enorme torcida que me incentiva, em especial as minhas avós Cenyr e Dinalva e tia Lilian. Aos meus cunhados Juliana e Luís Eduardo pelo enorme carinho.

Aos queridos amigos do CTZL, Carolina Gonzales e Heidi Bessler pela parceria diária, por estarem ao meu lado nos melhores e nos piores momentos desse trabalho, pela amizade que dividimos durante esses anos, vocês foram essenciais nesse trabalho e agora são essenciais na minha vida. A Andrielle Mendes por continuar presente mesmo de longe. Ao George Henrique pela amizade e disponibilidade em ajudar.

À minha querida amiga, Lara de Melo por ter sempre me incentivado a chegar até aqui, pela sua torcida mesmo longe, pela paciência nos momentos tensos, pelas palavras de apoio nos momentos de desânimo, pelo colo nos vários momentos de choro.

As minhas amadas, Glênia Rosa e Jessyka Florindo pela amizade que nos permite abrir a alma sem medo, vocês são um bálsamo na minha vida.

Aos amigos da IPN pelo incentivo e pelas orações. Em especial à Ana Maria Machado e Silvia Drummond pela amizade e suporte.

Ao Dr. Maurício Machaim pelas ideias inovadoras e auxílio durante o experimento.

Ao Dr. César Koppe Grisolia pela disponibilidade em ajudar com as avaliações citogenéticas.

Ao Dr. Rodolfo Rumpf e Dr. Cláudio Afonso pela disponibilidade em participar da banca e em contribuir no enriquecimento do trabalho.

Ao Juaci Malaquias pelas análises estatísticas que contribuíram para a conclusão do trabalho.

À equipe do CTZL Godoy, Cléber, Silvano, Wagner, Dona Marlene, Seu Luís, Álvaro, Kelly, Carlão e Fernando, pela amizade e apoio de diversas formas que auxiliaram na execução desse trabalho.

À equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB, especialmente à Ingrid Gracielle por me ajudar nas avaliações.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal pelo curso oferecido e por colaborar no meu desenvolvimento profissional. A Embrapa Cerrados - CTZL pelo apoio financeiro e a estrutura para realização do experimento. A CAPES, CNPq e o FAPDF pelo apoio financeiro.

As queridas, Jessyka Florindo e Silvia Drummond, pelas revisões.

Aos animais que foram objetos desse estudo, meu respeito.

À nossa filha, Brasília, a coroação do nosso trabalho.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Clonagem por transferência nuclear	3
2.2 Células doadoras de núcleo	4
2.2.1 Tipos celulares	5
2.2.1.1 Células do fluido amniótico	6
2.2.1.2 Células do cordão umbilical	7
2.3 Tempo de cultivo celular	8
2.4 Criopreservação	9
2.4.1 Crioprotetores	11
2.5 Reprogramação epigenética	12
2.5.1 Agentes modificadores de cromatina	15
3 HIPÓTESES	17
4 OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo geral	18
4.2 Objetivos específicos	18
5 MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1 Delineamento Experimental	19
5.1.1 Experimento 1: Avaliação da qualidade celular em células do fluido amniótico e do cordão umbilical submetidas a diferentes tempos de cultivo <i>in vitro</i> e a diferentes crioprotetores-	19
5.1.2 Experimento 2: Uso das células do cordão umbilical na transferência nuclear e uso da Procaina e da Tricostatina A para otimizar a reprogramação celular-	19
5.2 Isolamento e cultivo de células do fluido amniótico e do cordão umbilical	20
5.3 Criopreservação dos tipos celulares em diferentes soluções crioprotetoras	23
5.4 Avaliação da viabilidade celular pós-criopreservação	24
5.5 Avaliação de fragmentação de DNA pelo método do TUNEL	24
5.6 Avaliação da instabilidade cromossomal por citogenética clássica	25
5.7 Avaliação ultraestrutural	25
5.8 Tratamento das células do cordão umbilical com procaina e tricostatina A	26
5.9 Transferência nuclear	26
5.10 Análise estatística	29
6. RESULTADOS	30
6.1 Isolamento e cultivo de células do fluido amniótico e do cordão umbilical	30

6.2 Comparação entre crioprotetores	32
6.3 Avaliação do efeito das passagens celulares	33
6.4 Avaliação ultraestrutural em Microscopia Eletrônica de Varredura	36
6.5 Produção de embriões por transferência nuclear	38
7. DISCUSSÃO	40
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	54
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1	Fotomicrografias do processo de coleta de material dos fetos, mensuração e sexagem.	21
Figura 2	Esquema da criopreservação nas diferentes passagens celulares (P3, P5, P10, P15 e P20) nas células do cordão umbilical (CCU), células do fluido amniótico (CFA) e em células de fibroblastos da orelha (CFO).	23
Figura 3	Desenho experimental da transferência nuclear.	29
Figura 4	Fotomicrografias da morfologia dos três tipos celulares em cultivo durante as passagens (P5 – P20).	31
Figura 5	Diferenças no tempo de crescimento nas diferentes passagens nas células de fibroblastos da orelha (CFO) com células do cordão umbilical (CCU) e células do fluido amniótico (CFA).	32
Figura 6	Células com DNA íntegro (% - médias) no teste de fragmentação de DNA pelo TUNEL comparando células de fibroblastos da orelha (CFO) com células do cordão umbilical (CCU) e células do fluido amniótico (CFA).	35
Figura 7	Fotomicrografias de células do cordão umbilical (CCU): Avaliação da fragmentação do DNA pelo método do TUNEL.	35
Figura 8	Cariótipo normal de macho com 60 cromossomos (XY): Cariótipo de células de fibroblastos da orelha em P10 (A) e células do cordão umbilical em P10 (B).	35
Figura 9	Avaliação ultraestrutural dos três tipos celulares em P3 congelados em 10% de DMSO.	37
Figura 10	Células do cordão umbilical tratadas com procaína.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1	Informações dos fetos coletados.	22
Tabela 2	Comparação da viabilidade celular (média e desvio padrão) pós-descongelamento em P3 comparando três crioprotetores diferentes.	33
Tabela 3	Comparação da viabilidade celular (média e desvio padrão) pós-descongelamento ao longo das passagens (P5, P10, P15 e P20).	34
Tabela 4	Quantidade e taxas de estruturas maturadas, reconstruídas, fusionadas/cultivadas, clivadas e blastocistos tratados com TSA e grupo controle.	39

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

- °C – Graus Celsius
- CCC – Complexo carioplasto-citoplasma
- CCO- Complexo cumulus-oócito
- CCU – Células do cordão umbilical
- CFA – Células do fluido amniótico
- CFO- Células de fibroblasto da orelha
- CTMs – Células tronco mesenquimais
- DMEM - Dubelccos Modified Eagle Medium
- DMF – Dimetilformamida
- DMSO- Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxiribonucleico
- DNMTs – DNA metiltransferases
- FSH – Hormônio folículo estimulante
- GLI- Glicerol
- HDACs – Histonas desacetilases
- LH – Hormônio luteinizante
- M – Molar
- mg – Miligrama
- µg- Micrograma
- µL- Microlitro
- µm – Micrometro
- µs- Microsegundos
- MIV- Maturação in vitro
- mL – Mililitro
- mm – Milímetro
- mM – Milimolar
- MPF – Fator promotor de maturação
- NL₂ – Nitrogênio líquido
- nM – Nano molar
- P# - Número da passagem
- PBS – Solução salina tamponada com fosfato
- SFB – Soro fetal bovino

SOF – Meio de cultivo de fluido de oviduto sintético

TCM – *Tissue culture medium*

TN – Transferência nuclear

TSA – Tricostatina A

UI – Unidade internacional

UV – Ultravioleta

RESUMO

EFEITOS DO CULTIVO *IN VITRO* PROLONGADO, CRIOPRESERVAÇÃO E USO DE AGENTES MODIFICADORES DE CROMATINA EM CÉLULAS DO AMNIÓTICO E DO CORDÃO UMBILICAL DE FETOS BOVINOS PARA USO NA TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

Elisa Ribeiro da Cunha^{1,2}, Sônia Nair Bão¹

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Animal- UnB, DF, ²Embrapa Cerrados -CTZL

Apesar de todo o potencial para o uso da transferência nuclear (TN) em bovinos, vários parâmetros continuam limitantes para a melhor eficiência da técnica. Considerando essas limitações, este trabalho propõe o uso de modelos celulares que não passaram pela gastrulação, sob influência do cultivo *in vitro* por longos períodos e diferentes formas de criopreservação. Em seguida, o melhor tipo celular para a produção de embriões por TN foi avaliado sob o efeito de tratamentos que otimizem reprogramação nuclear. Células do fluido amniótico (CFA) e do cordão umbilical (CCU) foram utilizadas em comparação aos fibroblastos da orelha (CFO) e foram submetidos ao cultivo celular por 20 passagens e criopreservação em diferentes soluções contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 5% de dimetilformamida e 7% de glicerol. A viabilidade celular, ultraestrutura, fragmentação do DNA e estabilidade cromossomal foram avaliadas para determinar o tipo celular mais resistente. Em todos os animais, foi possível avaliar as CFA e CCU por 20 passagens com diferentes tempos de crescimento celular para atingir a fase de confluência. As soluções com 10% de DMSO garantiram a viabilidade de $90,33 \pm 5,58\%$, $90,56 \pm 4,40\%$ e $81,90 \pm 3,31\%$, respectivamente para CFO, CCU e CFA, sendo significativamente mais eficiente e com menor variação para preservação que as outras soluções crioprotetoras. Não houve alterações no cariótipo e houve baixa fragmentação nuclear ao longo das passagens estudadas. Na avaliação ultraestrutural, as CFA se mostraram mais sensíveis à criopreservação em relação às CCU e CFO, e apresentaram uma baixa viabilidade em P20 ($17,2 \pm 8,87\%$). A partir deste experimento, as CCU foram usadas na TN e submetidas a três tratamentos: (T1) CCU foram tratadas com 1,5 mM de procaína por dois ciclos de crescimento; (T2) tratadas com 50 nM de tricostatina A (TSA) por 4h na ativação e 20 h no cultivo embrionário; (T3) tratadas com 50 nM de TSA por 4 h na ativação e 16 h no cultivo embrionário. Todos os tratamentos foram comparados com o grupo sem tratamento (controle). O tratamento com procaína provocou alterações na morfologia e teve baixa produção de blastocistos (4,4%). O tratamento com TSA por 24 h teve baixa produção de blastocistos (4,5%) e foi significativamente diferente da TSA 20 h e do controle. O tratamento por 20 h (17,19%) viabilizou o uso da TSA, mas não foi superior ao controle (21,73%). Os resultados demonstram que, em bovinos as CFA e CCU podem ser isoladas, cultivadas *in vitro* e criopreservadas em 10% de DMSO, apresentando estabilidade cromossomal e baixa fragmentação nuclear, sendo que as CCU são mais resistentes que as CFA. O uso de 1,5 mM de procaína e de 50 nM de TSA por 24 h não foram viáveis na produção de embriões por TN. Porém, o uso de 50 nM TSA por 20 h não comprometeu a produção de blastocistos produzidos por TN. No entanto, concentrações e tempo de exposição ao TSA diferentes devem ser testados para aumentar a produção embrionária e o nascimento de bezerros saudáveis.

Palavras chave: células fetais; tecido extra-embrionário, tricostatina A; dimetilsulfóxido; clonagem animal; reprodução animal assistida.

ABSTRACT**EFFECTS OF PROLONGED *IN VITRO* CULTURE, CRYOPRESERVATION AND USE OF CHROMATIN MODIFYING AGENTS ON AMNIOTIC FLUID AND UMBILICAL CORD CELLS FROM BOVINE FETUSES FOR USE IN NUCLEAR TRANSFER**Elisa Ribeiro da Cunha^{1,2}, Sônia Nair Bão¹¹Programa de Pós-graduação em Biologia Animal- UnB, DF, ²Embrapa Cerrados –CTZL

Despite all the potential of animal cloning by nuclear transfer (NT), some parameters still limit the efficiency of this technique. Considering these limitations, the objective of this work was to study the cellular types that did not participated in the gastrulation process, in conditions of long-term culture and cryopreservation with different solutions. We also studied the potential of these cell types to produce embryos by NT when reconstructed zygotes were treated with substances to optimize nuclear reprogramming. Amniotic fluid cells (AFCs) and umbilical cord cells (UCCs) were used in a comparative study with ear fibroblast cells (EFCs) that were cultured *in vitro* until 20 passages and cryopreserved in 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO), 5% Dimethyl formamide and 7% Glycerol solutions. The cellular viability, ultrastructure, DNA fragmentation and chromosome stability were evaluated to determine the most resistant cellular type. In all animals, it was possible to evaluate the AFCs and UCCs until 20 passages with different periods of cellular growth to reach the confluence phase. Solutions containing 10% DMSO ensured viability of $90.33 \pm 5.58\%$, $90.56 \pm 4.40\%$ and $81.90 \pm 3.31\%$, respectively for EFCs, AFCs and UCCs, being significantly more efficient and with less variation than other cryoprotectant solutions. There was no changes in karyotype and nuclear fragmentation was low at the cellular passages studied. In the ultrastructural evaluation, AFCs were more sensitive to cryopreservation than UCCs and EFCs and presented low viability rate at P20 ($17.2 \pm 8.87\%$). From these results, the UCCs were used in the NT and submitted to three treatments: (T1) UCCs were treated with 1.5 mM procaine in two growth cycles; (2) reconstructed oocytes treated with 50 nM of trichostatin A (TSA) for 4 h in the activation phase and for 20 h in embryo development; (3) reconstructed oocytes treated with 50 nM TSA for 4 h in the activation phase and for 16 h during initial embryo culture. All treatments were compared with the untreated group (control). Treatment with procaine caused changes in cellular morphology and resulted in low blastocysts rate (4.4%). Treatment with TSA for 24 hours had low blastocyst production (4.5%) and was significantly different from the control and TSA 20 h treatment. The treatment for 20 hours made feasible the use of TSA (17.19% of blastocysts), but was not superior to the control group (21.73%). The results demonstrate that in bovine, AFCs and UCCs can be isolated, cultured *in vitro* and cryopreserved in 10% DMSO, not causing damage to DNA and chromosomes. The UCCs were more resistant than AFCs in all aspects. The use of 1.5 mM procaine and 50 nM TSA for 24 hours was not viable for NT embryos production. However, the use of 50 nM TSA for 20 hours did not compromise the blastocysts production, but different concentrations and times of exposure to TSA should be tested to enhance bovine NT embryo production and birth of healthy calves.

Keywords: foetal cells; extraembryonic tissues, trichostatin A; dimethyl sulfoxide; animal cloning; animal assisted reproduction

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação e a estocagem de gametas e embriões de animais são a chave para os bancos de germoplasma. Entretanto, gametas e embriões são finitos e precisam ser repostos constantemente quando usados com regularidade, o que não é possível se o doador está inacessível ou morto (Nel-Themaat *et al.*, 2007). Portanto, a criopreservação de células viáveis assume um papel de importância nos bancos de germoplasma (Ryder, 2002). Apesar dessas células serem também finitas quanto a coleta, elas podem ser propagadas usando culturas celulares específicas e depois, criopreservadas e estocadas por muitos anos.

O nascimento do primeiro mamífero por transferência nuclear (TN) a partir de células somáticas adultas (Wilmot *et al.*, 1997; Wakayama *et al.*, 1998) demonstrou que o núcleo de uma célula somática adulta mantém a totipotência e pode sofrer reprogramação celular.

Apesar de todo o potencial para o uso da TN, vários parâmetros continuam limitantes para a melhor eficiência da técnica. Um pré-requisito importante é a disponibilidade de células capazes de sofrer reprogramação nuclear para suportar o desenvolvimento embrionário e fetal (Mastromonaco *et al.*, 2006).

Muitas pesquisas foram desenvolvidas evidenciando que células somáticas de diferentes tecidos e idades podem ser utilizadas com sucesso em programas que necessitem de um material genético viável para serem reprogramados. Contudo, o modelo celular mais utilizado continua sendo o de fibroblastos da pele obtidos de biópsias de feto ou de animais adultos (Nel-Themaat *et al.*, 2007).

Quanto ao tempo de cultivo celular, a viabilidade das células somáticas adultas tem sido amplamente limitada ao período de utilização das células doadoras, ou recém-colhidas, ou após o cultivo *in vitro* por períodos curtos (Kubota *et al.*, 2000).

A avaliação da qualidade e resistência celular é necessária para garantir a máxima eficiência na TN como doadoras de seu material genético, que tem relação direta com o desenvolvimento potencial do embrião (Mastromonaco *et al.*, 2006).

Outro parâmetro limitante na TN é a reprogramação nuclear relacionada com a capacidade das células suportarem um desenvolvimento embrionário e fetal adequado. As modificações na estrutura da cromatina e alterações epigenéticas são consideradas como os principais fatores determinantes para o sucesso da TN (Suttevun *et al.*, 2006).

A partir do conhecimento desses gargalos na transferência nuclear em bovinos, esta pesquisa propôs estudar as células do fluido amniótico e células do cordão umbilical, como células com potencial para aumentar a eficiência da TN, uma vez que é possível que apresentem uma menor diferenciação em relação às células somáticas adultas. Desta forma, o trabalho teve o objetivo de avaliar o comportamento destes tipos celulares durante um longo período de cultivo *in vitro*, a criopreservação e ao tratamento com substâncias que facilitem a reprogramação epigenética, visando a identificar melhorias na clonagem bovina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Clonagem por transferência nuclear

A TN foi, inicialmente, proposta por Spemann (1938), sendo utilizada como ferramenta para conhecer o papel do material genético na diferenciação celular em anfíbios. Posteriormente, foi realizada a primeira transferência nuclear em anfíbios (Briggs e King, 1952) e, algum tempo depois, foi utilizada demonstrando o potencial de reprogramação de células diferenciadas utilizando *Xenopus* adultos (Gurdon e Uehlinger, 1966).

Em mamíferos, o desenvolvimento da TN ocorreu de maneira lenta, sendo relatada, a partir de 1975 em coelhos (Bromhall, 1975). Em 1986, a técnica foi realizada em ovinos (Willadsen, 1986) e em seguida em bovinos (Prather *et al.*, 1987), sendo ambas realizadas a partir da utilização de blastômeros como fontes doadoras de núcleos.

Trabalhos subsequentes demonstraram que células completamente diferenciadas poderiam ser usadas, como ficou demonstrado pelo nascimento da ovelha Dolly, o primeiro mamífero clonado com células somática da glândula mamária coletada de animal adulto (Wilmut *et al.*, 1997). Posteriormente, a técnica foi estabelecida em bovinos (Cibelli *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1998), caprinos (Baguisi *et al.*, 1999), gaur (Lanza *et al.*, 2000), lhamas (Sansinena *et al.*, 2003), bubalinos (Shin *et al.*, 2007) e cervos (Berg *et al.*, 2007).

Atualmente, a TN é uma técnica utilizada em diferentes espécies animais para estudos de reprogramação celular e epigenética. A TN atende aos programas de melhoramento genético com a rápida multiplicação de animais com características genéticas desejáveis, proporcionando uma diminuição no intervalo de gerações e também possibilitando a conservação e regeneração de recursos genéticos em vias de extinção.

Porém, o mais importante impacto desta biotécnica está na produção de animais geneticamente modificados, pois essa tecnologia introduz genes específicos em linhagens celulares que são utilizadas como doadoras de núcleo na TN, resultando na produção de clones

transgênicos. Estes animais, certamente, têm várias aplicações na geração de produtos biomédicos (Rumpf, 2007).

Contudo, uma limitação potencial do uso de células de animais adultos transfectadas como doadoras de núcleo consiste no período de cultivo prolongado necessário para a programação, transfecção, seleção e expansão da linhagem celular. Cada uma destas etapas requer passagens repetidas, bem como períodos de cultivos longos que podem induzir perturbações nas células doadoras, resultando numa redução na eficiência da TN (Forsberg *et al.*, 2001).

Apesar de vários estudos sobre o assunto e da grande quantidade de animais clonados, inclusive comercialmente, a TN ainda apresenta baixa eficiência, resultados variáveis e complicações observadas nos produtos obtidos. A taxa de produtos vivos na maioria dos mamíferos esta abaixo de 5%, uma taxa inexpressiva, quando comparada com 40% de produtos vivos na fecundação *in vitro* (Wang *et al.*, 2011b). Em bovinos, apenas 4% a 8% dos embriões transferidos resultam em bezerros clonados vivos aos 150 dias. Um estudo realizado no Japão entre 1998 e 2007 revela que apenas 9,2% dos embriões transferidos se desenvolveram a termo (Akagi *et al.*, 2013).

Este fato pode ser relacionado com uma variedade de razões, tais como o tipo de célula doadora, a fonte e a qualidade do oócito ao início da maturação, o método de cultivo embrionário, as falhas da reprogramação nuclear, a variação entre laboratórios, as metodologias empregadas para as etapas de enucleação oocitária e reconstrução embrionária (Campbell *et al.*, 2007).

2.2 Células doadoras de núcleo

A célula doadora de núcleo utilizada na TN tem efeitos importantes sobre a capacidade de desenvolvimento de embriões reconstruídos até o estágio de blastocisto e também sobre o

desenvolvimento pós-implantação. Após a obtenção do primeiro mamífero a partir de células embrionárias (Campbell *et al.*, 1996) e de linhagens fetais e adultas (Wilmut *et al.*, 1997), muitos estudos foram realizados para demonstrar que células somáticas de diferentes tecidos e animais e idades podem ser utilizadas com sucesso. Como exemplos, tem-se o uso de fibroblastos adultos e fetais de diversos tecidos, células do cumulus, epitélio do oviduto (Kato *et al.*, 1998), epitélio mamário (Wilmut *et al.*, 1997), epitélio do útero e células do fígado, (Kato *et al.*, 2000). Porém, o modelo celular mais usado continua sendo os fibroblastos adultos obtidos de biópsias da pele da orelha ou da cauda.

2.2.1 Tipos celulares

As células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna do blastocisto e do zigoto. As primeiras possuem capacidade ilimitada de auto-renovação e são pluripotentes (capazes de se diferenciar em qualquer linhagem derivada dos três folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma). Já as células com origem a partir do zigoto são classificadas como totipotentes, pois além de se diferenciar nas células dos três folhetos embrionários, originam os tecidos extra-embrionários. As células-tronco mesenquimais (CTMs) adultas, aparentemente, têm capacidade de auto-renovação limitada e são denominadas multipotentes, pela habilidade limitada de diferenciação em poucos tipos celulares.

Os tecidos extra-embrionários originados diretamente do epiblasto, hipoblasto, e trofoblasto não participam da gastrulação e, por isso, são menos diferenciados que as células somáticas adultas e, devido a essa origem, são mais facilmente reprogramados (Cremonesi *et al.*, 2011).

Estas células não envolvem fatores éticos como as células-tronco embrionárias além de serem mais fáceis de serem obtidas. A Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*) propôs alguns critérios para a definição das

CTMs: a capacidade de crescimento *in vitro*, serem aderentes ao plástico, apresentarem auto-renovação, capacidade de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos. Além da expressão dos marcadores moleculares CD105, CD7 e CD90 e a ausência de expressão dos marcadores moleculares CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR (Horwitz *et al.*, 2005; Cremonesi *et al.*, 2011).

As CTMs fetais têm potencial de diferenciação em multilinhagens, apresentam alta cinética de crescimento e expressão de marcadores de pluripotencialidade e multipotencialidade, fornecendo assim a noção de que essas células são biologicamente próximas das células-tronco embrionárias e são intermediárias às CTMs adultas (Cremonesi *et al.*, 2011; Dev *et al.*, 2012b). Tais características têm despertado o interesse no uso de células para terapias e como doadoras de núcleo na TN (Dev *et al.*, 2012a).

Na medicina veterinária, as CTMs têm sido isoladas com sucesso da medula-óssea, pele, tecido adiposo e sangue periférico. Os tecidos que contêm células únicas e primitivas, como os extra-embrionários, tecidos e sangue do cordão umbilical, tecidos da placenta e fluido amniótico, são candidatos a serem fontes de CTMs fetais. Essas células podem ser utilizadas nas biotecnologias reprodutivas, tais como na clonagem por transferência nuclear e transgenia e, na biomedicina, principalmente nas terapias celulares (Cremonesi *et al.*, 2011).

2.2.1.1 Células do fluido amniótico

O fluido amniótico começa a aparecer no início da segunda semana de gestação, como uma pequena quantidade de líquido entre as células do epiblasto. Este fluido aumenta e separa o epiblasto -futuro embrião- do amnioblasto -futuro âmnio- formando a cavidade amniótica (Miki e Strom, 2006). O fluido amniótico é heterogêneo e contém vários tipos de células. Acredita-se que algumas destas possuem propriedades de células tronco embrionárias, células

diferenciadas e indiferenciadas provenientes dos três folhetos germinativos, sendo que a sua composição varia com a idade do feto (Dev *et al.*, 2012a).

O fluido amniótico, no terço inicial da gestação, é composto de CTMs fetais com potencial de diferenciação em multilinhagens, apresentando alta cinética de crescimento e expressão de marcadores de pluripotencialidade (Dev *et al.*, 2012a). Uma pequena porcentagem representa uma sub-população de células-tronco que expressa o *octamer-binding transcription factor 4* (OCT-4), o principal marcador específico de pluripotencialidade de células tronco (De Coppi *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). Essas células apresentam potencial para se diferenciar em adipócitos, condroblastos, osteoblastos, tecido osteogênico e linhagens de músculo liso (Cremonesi *et al.*, 2011).

As CTMs isoladas do líquido amniótico humano não mostraram anormalidades no cariótipo, sendo uma linhagem homogênea de células mesenquimais imaturas com longos telômeros e com grande potencial de proliferação (Cremonesi *et al.*, 2011).

As células do fluido amniótico foram caracterizadas como células tronco mesenquimais em humanos (De Coppi *et al.*, 2007), suínos (Zheng *et al.*, 2009), ovinos (Mauro *et al.*, 2010), equinos (Park *et al.*, 2011), cães (Filioli Uranio *et al.*, 2011), búfalos (Dev *et al.*, 2012ab) e felinos domésticos (Iacono *et al.*, 2012). Em bovinos, ainda não existem publicações sobre o isolamento do fluido amniótico e sua caracterização como CTMs.

2.2.1.2 Células do Cordão umbilical

No mesmo sentido, as células do cordão umbilical apresentam grande potencial para utilização como doadoras de material genético em processos de reprogramação nuclear.

O cordão umbilical é composto por veia e artéria umbilical; matriz perivascular e a geléia de Wharton ou matriz do cordão umbilical. Os vários constituintes do cordão são circundados por um tecido embrionário gelatinoso chamado geléia de Wharton, que é composto por

miofibroblastos, fibras de colágeno e proteoglicanos. As células do cordão umbilical tem sido isoladas de diferentes partes do cordão umbilical: do sangue (Iacono *et al.*, 2012), da veia (Zucconi *et al.*, 2010) e da geléia de Wharton (Iacono *et al.*, 2012).

Estudos comparativos de CTMs humanas de várias origens incluindo medula óssea, sangue do cordão umbilical e tecido adiposo revelou que as CTMs derivadas do sangue do cordão umbilical têm uma maior capacidade de proliferação, maiores telômeros, mais amplo potencial de diferenciação e a maior capacidade de expansão em cultura antes de se tornarem senescentes (Cremonesi *et al.*, 2011)

Recentemente, CTMs primitivas foram isoladas da matriz do cordão umbilical com marcadores específicos de pluripotencialidade e marcadores de CTMs (Cremonesi *et al.*, 2011). Além disso, essas células apresentaram potencial de se diferenciar em tecidos audiogênico, condrogênico, osteogênico e neurogênico. Em suínos, a matriz do cordão umbilical expressou os marcadores de linhagem embrionária OCT-3/4, SOX2 e NANOG (Carlin *et al.*, 2006). Nos equinos (Hoynowski *et al.*, 2007); caninos (Filioli Uranio *et al.*, 2011), suínos (Carlin *et al.*, 2006) e humanos (De Coppi *et al.*, 2007)., as células do cordão umbilical foram isoladas e caracterizadas como células tronco mesenquimais pela expressão de marcadores de pluripotencialidade e pela diferenciação em tecidos específicos: Em bovinos, foi descrito o isolamento e caracterização das células do sangue do cordão umbilical (Raoufi *et al.*, 2011) e da geléia de Wharton (Cardoso *et al.*, 2012) como CTMs.

2.3 Tempo de Cultivo Celular

O sucesso da clonagem tem sido limitado pelo uso de células logo após a coleta ou por curtos períodos de cultivo geralmente menos de 10 passagens de cultivo *in vitro*, o que não permite a manipulação de genes (Kubota *et al.*, 2000).

Entre as consequências de um longo cultivo *in vitro*, estão a instabilidade cromossômica e o encurtamento do telômero, o que favorece à perda da função de genes importantes ao desenvolvimento. Além disso, pode alterar a ploidia e provocar modificações nas histonas pós-translação, resultando numa redução da eficiência da técnica (Campbell *et al.*, 2007). As modificações na estrutura da cromatina e alterações epigenéticas são consideradas como fatores determinantes para o sucesso da TN (Suttevun *et al.*, 2006).

A maior parte das células cultivadas *in vitro* alcança um limite de proliferação, fenômeno denominado senescência replicativa (Mastromonaco *et al.*, 2006). Entretanto, Kubota e colaboradores (2000) demonstraram que fibroblastos da pele de um animal adulto, após um longo período de cultivo (15 passagens), mantiveram a sua totipotência, o que foi demonstrado pelo nascimento de dois produtos vivos.

A utilização de células oriundas de cultivos prolongados na TN traz a preocupação quanto a senescência, que reduz a eficiência da clonagem. A senescência celular compromete as divisões celulares, pode desestabilizar os eventos biológicos subsequentes após a enucleação, prejudicando e até interrompendo o desenvolvimento embrionário, o que a transforma em um fator limitante dessa biotécnica animal.

2.4 Criopreservação

A criopreservação é o processo pelo qual células, gametas, embriões e tecidos são adicionados aos crioprotetores que são compostos responsáveis por substituir a água intracelular e estabilizar as membranas, promovendo proteção às células, e em seguida passam pelo processo de redução de temperatura sendo armazenadas em temperaturas abaixo de zero, normalmente -196°C no nitrogênio líquido (NL_2) por um período de tempo indeterminado (Balci e Can, 2013).

As células doadoras de núcleo podem ser usadas antes ou depois da criopreservação, sendo que os melhores resultados têm sido obtidos com células recém-coletadas, o que se torna um limitante ao uso de células de bancos de germoplasma. Com o aumento da importância das biotécnicas celulares, o uso de criobanco ou bancos de germoplasma vem se tornando cada vez mais necessário. A criopreservação de células emergentes como os tecidos extra-embriônicos está ainda em desenvolvimento e os seus efeitos precisam ser ainda caracterizados (Balci e Can, 2013).

Poucos estudos tem sido realizados para caracterizar o efeito do procedimento de congelação das células no desenvolvimento subsequente do embrião. Diferentes métodos de congelação de células foram descritos. Fatores como o crioprotetor e a velocidade de congelação são os de maior impacto sobre as células após a descongelação (Hayes *et al.*, 2005).

Dois métodos têm sido usados para a criopreservação de células, a redução progressiva da temperatura e a vitrificação e ambos têm se mostrado eficientes. A redução progressiva da temperatura tem sido usada com curva controlada (automatizada) e não-controlada, e não foram encontradas diferenças entre esses métodos quando comparados (Janz *et al.*, 2012). Por isso, a curva não-controlada tem sido mais conveniente, pois evita o uso de equipamentos caros, sendo então de fácil execução e mais barata.

Juntamente à queda de temperatura, durante o processo de criopreservação, ocorre a organização das moléculas de água em cristais, e este fenômeno é, inicialmente, observado no meio extracelular. A formação destes cristais concentra os solutos na água não congelada aumentando a osmolaridade do meio extracelular e promovendo a desidratação celular. Porém, uma velocidade de resfriamento acelerada dificulta a migração da água do meio intracelular para o meio extracelular, fato que culmina em uma maior formação de cristais de gelo dentro da célula. Por outro lado, se a velocidade de congelação for demasiadamente lenta, a desidratação pode ser exacerbada levando ao “efeito solução”. Nessa situação, os componentes

celulares irão se precipitar em resposta a uma desidratação muito acentuada, comprometendo funções biológicas por meio da inviabilização de enzimas e proteínas. O ideal para processos de congelação seria um método capaz de evitar a formação de cristais de gelo sem causar o efeito solução (Janz *et al.*, 2012).

2.4.1 Crioprotetores

Os crioprotetores são divididos em duas principais classes: os intracelulares e os extracelulares. Os principais agentes intracelulares, que impedem a formação de cristais de gelo dentro das células, são dimetilsulfóxido, dimetilformamida, glicerol e etileno-glicol. Contrariamente, os agentes extracelulares são os compostos que não penetram a membrana celular e atuam reduzindo o efeito hiperosmótico que ocorre nos processos de congelação. Entre eles, estão a sacarose, trealose, dextrose, polivinilpirrolidona (Janz *et al.*, 2012).

O dimetilsulfóxido (Me_2SO - DMSO) é o crioprotetor permeável mais usado. Possui alto peso molecular ($\text{PM}=78,13$) dentre os intracelulares e é um composto polar de alta capacidade higroscópica (Balci e Can, 2013). O DMSO preserva a integridade de proteínas isoladas e das membranas lipídicas durante o processo de resfriamento e aquecimento. Essa característica faz com que seja o crioprotetor de eleição quando comparado com crioprotetores de baixo peso molecular. Sua desvantagem é a alta toxicidade, além da dificuldade de emprego, já que apresenta a necessidade de preparo no momento do uso, em função da característica higroscópica (Villamil, 2009).

A dimetilformamida ($\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$) é um composto orgânico pertencente à classe de crioprotetores permeáveis do grupo das aminas. Possui um menor peso molecular ($\text{PM}=73,09$) em relação ao DMSO, e por isso, pode ser mais facilmente absorvido, além de ser menos tóxico (Giraldo *et al.*, 2012). Sua configuração química apresenta três sítios de ligação do hidrogênio, que permite a ligação com as moléculas de água, aumentando a solubilidade e

proporcionando maior permeabilidade à membrana celular. Essa união das moléculas de água proporciona um aumento na indução do estado vítreo (Villamil, 2009).

O glicerol ($C_3H_8O_3$) é um crioprotetor permeável de alto peso molecular (PM=92,09), sendo um composto viscoso formado por um multi-álcool (Propan-1,2,3-triol). É muito utilizado por sua baixa toxicidade, mas pode induzir diversos danos osmóticos no citoplasma por apresentar baixa permeabilidade. O glicerol é o crioprotetor de ação mais lenta, característica atribuída ao seu alto peso molecular (Balci e Can, 2013).

Os crioprotetores extracelulares são mais usados na criopreservação de sêmen e na vitrificação, possuem alto peso molecular e não permeiam as membranas celulares, diminuem os efeitos osmóticos e tóxicos por promover a desidratação e vitrificação intracelular de maneira controlada e regulando a quantidade de crioprotetor intracelular. Os compostos mono ou dissacarídeos são capazes de preservar a estrutura e a integridade funcional das membranas. A sacarose, trealose e glicose são os açúcares mais empregados como crioprotetores extracelulares (Janz *et al.*, 2012).

2.5 Reprogramação epigenética

A reprogramação em mamíferos é um processo ordenado, que ocorre após a união das células germinativas levando à formação de um zigoto totipotente e indiferenciado. Nas divisões celulares subsequentes, os tipos celulares diferenciados e específicos passam a ser formados. Cada gameta possui a sua marca epigenética, e após a fecundação é necessário que ocorra uma reprogramação no genoma do zigoto, para que essas marcas epigenéticas dos gametas sejam apagadas e estabelecido um padrão embrionário (Surani, 2001).

A fertilização em mamíferos ocorre pela união de dois conjuntos de cromatina: a cromatina espermática altamente compactada com protaminas no lugar das histonas; e a cromatina do oócito menos compactada em nucleossomos e parada em metáfase II da meiose.

A remodelação dos padrões da cromatina gamética é coordenada pelos fatores do ooplasma, já a remodelação independente dos dois pares de cromatina é coordenada pelo nível do fator promotor de maturação (MPF) que está presente em altos níveis em oócitos em metáfase II da meiose (Mann e Bartolomei, 2002). Durante o desenvolvimento normal em mamíferos, logo após a fertilização, o genoma masculino é desmetilado usando um mecanismo ativo enquanto o genoma feminino resiste a esse processo e sofre desmetilação gradual e passiva nas divisões celulares subsequentes. No estágio de blastocisto, os dois genomas estão desmetilados (Yang *et al.*, 2007).

Muitos fatores têm sido relatados sobre a baixa eficiência da clonagem tais como as condições de cultivo *in vitro*, qualidade do oócito e a célula doadora de núcleo. Porém, o principal fator que tem sido atribuído à baixa eficiência da clonagem é a incorreta ou incompleta reprogramação das células doadoras, o que resulta em falhas epigenéticas (Wang *et al.*, 2011a). Assim, erros na metilação do DNA, acetilação das histonas e falhas na expressão gênica global são reportadas como os principais problemas encontrados em embriões clonados durante a pré-implantação, na placenta e em fetos abortados ou mortos logo após o nascimento (Wang *et al.*, 2011b).

A desmetilação pode ocorrer em células diferenciadas quando elas são introduzidas em um citoplasma, mas este processo não é eficiente e ainda não está claro como o oócito reconstruído reconhece e reprograma o padrão de metilação de uma célula somática (Fairburn *et al.*, 2002).

O procedimento de transferência nuclear inicia-se com a remoção da placa metafásica do oócito seguida da microinjeção e fusão da célula doadora de núcleo no oócito enucleado. A exposição da célula a um alto nível de MPF no oócito receptor provavelmente resulta na quebra do envelope nuclear e condensação dos cromossomos, seguida da ativação do oócito e a supressão da extrusão do segundo corpúsculo polar. Provavelmente, a atividade do MPF reduz,

a cromatina descondensa e ocorre a formação do pseudo-pronúcleo, seguidas pela replicação e divisão celular (Fairburn *et al.*, 2002).

A desmetilação inicial dos gametas apaga quase todo o padrão herdado exceto dos genes *imprinted*, sendo seguida por uma onda de metilação *de novo* que ocorre durante o desenvolvimento embrionário inicial, estabelecendo assim os padrões de metilação do embrião (Mann e Bartolomei, 2002). Os embriões clonados são muito mais metilados que embriões de fertilização *in vitro* (Ding *et al.*, 2008).

Dean e colaboradores (2001) relataram que o pseudo-pronúcleo formado da célula doadora sofre desmetilação ativa. Nos embriões normais, parece ocorrer uma desmetilação passiva durante as divisões celulares e logo em seguida uma metilação *de novo* precoce em embriões de 4-8 células. Nas mórulas de clones, o padrão de metilação é mais próximo do núcleo da célula somática que os embriões normais de 16 células. Estes resultados estão em contraste com os reportados por Bourc'his e colaboradores (2001), os quais não observaram desmetilação ativa em zigotos de clones bovinos e que o padrão somático da célula doadora estava presente durante o estágio de 4 células. Já nos estágios de 8 células, mórula e blastocisto, a eucromatina estava desmetilada enquanto a heterocromatina do centrômero já tinha o padrão da metilação *de novo*.

A diferença nesses resultados para a desmetilação ativa inicial pode ser explicada pelo método usado, e talvez pela idade da célula usada. No estudo de Dean *et al.* (2001), foi utilizado fibroblasto fetal; e no de Bourc'his e colaboradores (2001), fibroblasto da pele quiescente, sugerindo que células mais velhas são mais resistentes a reprogramação. Concordando com estes dados, Daniels *et al.* (2000; 2001) encontraram evidências de que o perfil da expressão gênica da célula doadora pode afetar o perfil de expressão dos blastocistos clonados produzidos.

As histonas exercem uma dupla função no núcleo: são um componente estrutural e regulam a expressão gênica. O nível global da acetilação das histonas diminui drasticamente após a fertilização, mas aumenta logo em seguida. Embora ocorra uma desacetilação-reacetilação em embriões clonados, acontece uma incompleta acetilação da histona, que afeta o desenvolvimento subsequente (Ding *et al.*, 2008).

2.5.1 Agentes modificadores de cromatina

Com o objetivo de facilitar a reprogramação nuclear, as células doadoras e oócitos reconstruídos têm sido tratados com agentes farmacológicos para remover marcas epigenéticas (Tsuji *et al.*, 2009), alterando a acetilação das histonas e a metilação do DNA. Em células doadoras e embriões bovinos, foram testados vários agentes modificadores de cromatina tais como: a 5-aza-2'deoxicitidina (Enright *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2008); procaína (Lacerda, 2010); ácido valproíco (Sangali *et al.*, 2012); hidralazina (Sangali *et al.*, 2012); S-adenosil-L-homocisteína (Jeon *et al.*, 2008) e a tricostatina A (Kishigami *et al.*, 2006).

A tricostatina A (TSA) é um produto natural isolado do *Streptomyces higroscopicus*, sendo, a droga mais usada em vários estudos seletivos das histonas desacetilases (HDACs) (Akagi *et al.*, 2011) por ser um agente inibidor da desacetilação das histonas que aumenta o pool de histonas acetiladas (Lee *et al.*, 2011). A TSA age diretamente inibindo as HDACs, e levando a um aumento nos níveis da acetilação da H3K9. O tratamento com TSA pode resultar em desmetilação do DNA uma vez que a inibição da HDACs ajuda a recrutar proteínas responsáveis por esse processo (Sangali *et al.*, 2012). A TSA inibe seletivamente a metilação do DNA dependendo do tipo celular e da região do genoma (Kishigami *et al.*, 2007). Alternativamente, alguns inibidores das HDACs, os quais compartilham mecanismos de ação com a TSA, facilitam a desmetilação ativa do DNA independente da replicação deste.

Enright *et al.*(2003) relatou o aumento dos índices de blastocistos ao tratar fibroblastos com TSA antes da reconstrução. Kishigami *et al.* (2006) relataram que o tratamento de embriões reconstruídos de ratos aumentou as taxas de blastocisto. Alguns estudos têm demonstrado que o tratamento de fibroblastos com a 5-aza-2-deoxicitidine (5aza-2dc), um agente desmetilante do DNA, em combinação com a Tricostatina A (TSA), um agente que aumenta a acetilação das histonas, tem alterado as marcas epigênicas e melhorado os índices de blastocisto (Enright *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011ab).

A procaína (para-amino-benzoil-dietilamino-etanol), um derivado do 4-aminobenzoico-ácido, é sintetizada no fígado e possui atividade enzimática no plasma e no fígado, possui propriedade anestésica, não apresenta apresenta ação como anestésico superficial e é uma substância solúvel em água ou álcool. Após a sua degradação, os produtos liberados são o ácido para-aminobenzóico (PABA) e o álcool dietilamino (princípio ativo da procaína) (Lacerda, 2010).

A procaína é um inibidor da metilação do DNA que não é incorporada ao DNA, evitando assim efeitos citotóxicos, e não precisa de uma replicação para começar a interferir no processo de metilação de DNA. A procaína é um composto semelhante a procainamida, mas possui ação distinta em sua interação com proteínas, DNA e outras biomoléculas. Possuindo efeito inibitório sobre o crescimento de células cancerosas humanas interagindo com o genoma em regiões ricas em CpG e impedindo a ação das DNA metiltransferases (DNMTs) (Villar-Garea *et al.*, 2003). Além disso, é uma substância que apresenta baixa toxicidade, sendo capaz de reativar genes silenciados por hipermetilação. Em células cancerosas, ela induz a parada do ciclo celular em mitose e a desmetilação de DNA à medida que se aumenta o período de tratamento e a concentração utilizada (Lacerda, 2010).

3. HIPÓTESES

O cultivo *in vitro* prolongado e a criopreservação não alteram as características celulares das células do cordão umbilical e do fluido amniótico de fetos bovinos.

O tratamento com procaína das células do cordão umbilical aumenta a produção de embriões por transferência nuclear.

O uso da tricostatina A na ativação e cultivo de embriões reconstruídos com células do cordão umbilical aumenta a produção de embriões por transferência nuclear.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade das células do fluido amniótico e do cordão umbilical submetidas a diferentes períodos de cultivo e formas de criopreservação, visando a determinar o tipo celular mais resistente e com potencial de uso na transferência nuclear. E em seguida, testar o melhor modelo celular na transferência nuclear usando a procaína ou a tricostatina A, visando favorecer a reprogramação nuclear e aumentar a eficiência na produção de embriões em bovinos.

4.2 Objetivos específicos

- Isolar e cultivar por 20 passagens as células do fluido amniótico (CFA), células do cordão umbilical (CCU) e comparar com células de fibroblastos da orelha (CFO) (controle);
- Avaliar os efeitos da criopreservação das CFA, CCU e CFO em três soluções crioprotetoras (10% de DMSO, 5% de DMF e 7% de GLI) após a 3ª passagem do cultivo (P3) na viabilidade celular;
- Avaliar o efeito do tempo de cultivo nas passagens (P5, P10, P15 e P20) das CFA, CCU e CFO na viabilidade celular, a fragmentação do DNA e a instabilidade cromossomal;
- Avaliar a ultraestrutura celular de CFA, CCU e CFO por microscopia eletrônica de varredura após a 3ª passagem do cultivo celular e criopreservadas em 10% de DMSO;
- Avaliar os efeitos do tratamento com procaína e tricostatina A na taxa de clivagem e blastocisto de embriões reconstruídos com CCU.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento Experimental

5.1.1 Experimento 1 – Avaliação da qualidade das células do fluido amniótico e do cordão umbilical submetidas a diferentes tempos de cultivo *in vitro* e a criopreservação com diferentes crioprotetores

O objetivo deste experimento foi avaliar os efeitos do cultivo celular *in vitro* prolongado e da criopreservação no tempo de confluência celular, viabilidade, fragmentação do DNA, estabilidade cromossomal, morfologia e a ultraestrutura das células do fluido amniótico e do cordão umbilical em relação aos fibroblastos da orelha de fetos bovinos. E a partir desse experimento escolher tipo celular mais resistente ao cultivo *in vitro* prolongado e a criopreservação, bem como o melhor crioprotetor para, posteriormente, testar este modelo celular na transferência nuclear.

5.1.2 Experimento 2 – Uso das células do cordão umbilical tratadas com procaína e uso da tricostatina A na ativação e cultivo embrionário para otimizar a reprogramação nuclear na transferência nuclear.

A finalidade deste experimento foi avaliar as células do cordão umbilical na transferência nuclear, analisar o tratamento das células do cordão umbilical com procaína e o tratamento com tricostatina A durante a ativação e cultivo dos embriões. A eficiência dos tratamentos foi determinada pela mensuração das taxas de clivagem e a produção de blastocistos em relação ao grupo não tratado.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Cerrados localizado no Centro de Transferência de Tecnologia de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira e no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília.

5.2 Isolamento e cultivo de células do fluido amniótico e do cordão umbilical

Foram coletados três fetos bovinos em abatedouro local com medidas entre 7 a 20 cm e transportados em sacos individuais para o laboratório. Foi realizada a assepsia dos úteros com água destilada e álcool 70% antes da exposição da membrana amniótica e, em seguida, esta foi exposta com auxílio de tesoura e bisturi (figura 1A). Com seringa de 20 mL e agulha de 18 gauge, foram coletados 30 mL de líquido amniótico de cada animal (figura 1B) e centrifugados a 500xg por 10 minutos para sedimentação celular. O *pellet* isolado foi diluído com meio de cultivo Amniomax Complete® (Gibco-BRL/Life Technologies, Rockville, MD USA), sendo as células obtidas cultivadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm².

Após a abertura do saco amniótico, os fetos foram expostos e a distância *crown-rump* segundo descrito por Hughes e Davies (1989), foi mensurada para estimar a idade fetal (Figura 1G). Em seguida, o sexo fetal foi determinado pela observação da posição do tubérculo genital, sendo o feto identificado como macho quando o tubérculo genital estava localizado após o cordão umbilical (Figura 1H) e como fêmea quando este estava situado próximo a cauda (Figura 1I). Neste estudo, somente fetos machos foram utilizados para os experimentos.



Figura 1. A) Dissecação das camadas uterinas, local de abertura (seta); B) Aspiração do líquido amniótico com auxílio de seringa para isolamento das células do fluido amniótico; C) Local de coleta da orelha (seta); D) Local da coleta do cordão umbilical (seta); E) Placa de Petri com biópsias do cordão umbilical (seta) e orelha (cabeça de seta); F) Placa de Petri com as biópsias do cordão umbilical; G) Medida do feto para estimar a idade fetal; Sexagem pela posição do tubérculo genital: H) Macho - tubérculo próximo ao cordão umbilical (seta); I) Fêmea - tubérculo próximo a cauda (seta).

Este estudo buscou uniformizar os resultados usando apenas células doadoras de animais machos, pois o sexo do embrião pode influenciar no aumento da taxa de blastocisto e na manutenção da gestação.

Os dados dos três fetos coletados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Informações dos fetos coletados.

	Tamanho (cm)	Idade (dias)	Sexagem
Animal 1	17	95	Macho
Animal 2	8	63	Macho
Animal 3	19	98	Macho

As células foram retiradas diretamente do cordão umbilical (Figura 1D), composto pela veia e artéria umbilical; matriz perivascular e a geléia de Wharton. Estas estruturas (Figura 1E) foram cortadas em pequenos fragmentos e depositadas no fundo da placa de Petri para aderência do material (Figura 1F). As biópsias foram cobertas com *Dubelccos Modified Eagle Medium* (DMEM, Invitrogen Life Science, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,2% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Os tecidos foram mantidos em incubadora com 5% CO₂ a 38,5°C por sete dias ou até o crescimento celular ao redor das biópsias. Após a retirada das biópsias, o meio de cultivo foi substituído e, quando as células atingiram o estado de confluência celular, foram transferidas para garrafas de cultivo.

Como controle da qualidade e viabilidade celular foram utilizados fibroblastos da orelha dos próprios fetos. Para obtenção, as orelhas dos fetos (Figura 1C e 1E) foram isoladas e o mesmo protocolo usado para o cultivo do cordão umbilical foi utilizado. Todos os tipos celulares foram cultivadas até a vigésima passagem (P20), e durante esse período foram monitorados os tempos de confluência e a morfologia celular em comparação com os fibroblastos.

5.3 Criopreservação dos tipos celulares em diferentes soluções crioprotetoras

Quando as células do fluido amniótico, cordão umbilical e fibroblastos de pele atingiram a terceira passagem celular (P3), estas foram congeladas em três crioprotetores: T1- 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO), T2- 5% de Dimetilformamida (DMF) e T3- 7% de Glicerol (GLI). Cada crioprotetor foi diluído no meio de cultivo utilizado para cada tipo celular. As células foram armazenadas em palhetas de 0,25 mL e congeladas em freezer -80°C por 24 horas e depois armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C). As células foram criopreservadas em P3 nos três crioprotetores e nas demais passagens (P5, P10, P15 e P20), foram criopreservadas somente em solução com 10 % de DMSO em meio de cultivo base, pois foi o crioprotetor mais eficiente para todos os tipos celulares. O esquema de criopreservação dos tipos celulares pode ser visualizado na figura 2.

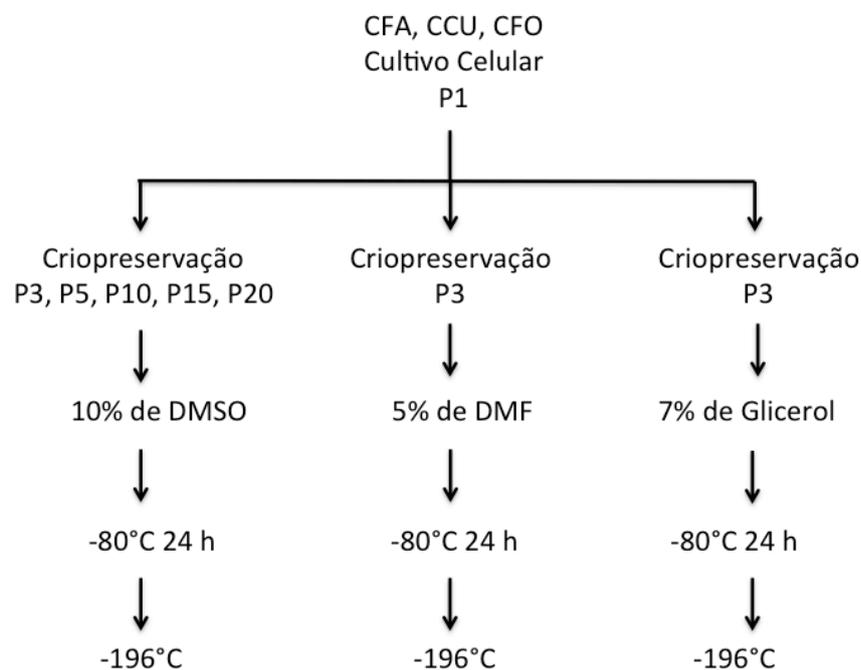


Figura 2. Esquema da criopreservação nas diferentes passagens celulares (P3, P5, P10, P15 e P20) para células do cordão umbilical (CCU), células do fluido amniótico (CFA) e células de fibroblastos da orelha (CFO).

5.4 Avaliação da viabilidade celular pós-criopreservação

A viabilidade celular pós-descongelamento foi avaliada utilizando-se o corante azul de trypan a 4%. As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 36°C/30s, misturadas na proporção 1:1 (v/v), corante e a amostra de células, seguido de incubação a 36°C/6 min. A viabilidade celular foi avaliada em câmara de Neubauer para guiar a contagem sob microscópio de campo claro. Foram contadas 300 células em duas repetições. Células com a presença do corante (azul) foram consideradas mortas. A viabilidade celular foi avaliada em P3 para determinar o melhor crioprotetor e repetida em P5, P10, P15 e P20 para comparar o efeito das passagens.

5.5 Avaliação de fragmentação de DNA pelo método do TUNEL

A avaliação do nível de fragmentação de DNA pós criopreservação dos tipos celulares foi realizada segundo Martins *et al.* (2007) com modificações usando o kit “*In Situ Cell Death Detection*”. Inicialmente, as células foram lavadas em PBS com albumina sérica bovina (BSA) a 0,1%. As suspensões de células foram fixadas com paraformaldeído a 4%/1 h. As células foram lavadas novamente com PBS contendo BSA a 0,1% e permeabilizadas a 4°C com Triton X-100 a 0,5% e citrato de sódio a 0,1% em PBS. Então, as células foram lavadas em PBS com BSA a 0,1% e incubadas no escuro em câmara úmida a 37°C/1 h com o kit de reação do TUNEL, contendo *terminal deoxy nucleotidyl transferase* (TdT) com *dUTP label* (nucleotídeos marcados) e isocianato de fluoresceína. Em seguida, as células foram lavadas e contra-coradas com *Hoescht 33342* para visualizar o DNA genômico total. Controles negativo (não adicionando TdT) e positivo (tratado com solução DNase e, em seguida, com o kit de reação do TUNEL) foram realizados em cada amostra. As amostras foram observadas utilizando microscópio de epifluorescência, foram contadas 100 células em duas repetições. A

fragmentação do DNA foi avaliada em P5, P10, P15 e P20 para comparar o efeito das passagens.

5.6 Avaliação da instabilidade cromossomal por citogenética clássica

Na avaliação citogenética as células foram sincronizadas em metáfase pela incubação em colchicina (0,1 µg/mL) por 4 h. Em seguida, o meio foi desprezado, as células foram lavadas e tratadas com tripsina, armazenadas em microtubos e incubadas para hipotonização por 30 min a 38,5°C em KCl a 0,075M. A suspensão celular foi centrifugada a 2000g por 5 minutos, e o sedimento foi diluído em metanol e ácido acético (3:1) para fixação das células, sendo este procedimento repetido três vezes. As células foram dispersas em lâminas geladas e molhadas, em seguida coradas com Giemsa 5% e os cromossomos foram avaliados sob microscópio de campo claro. Foram montadas de 5 a 10 lâminas e avaliadas 10 metáfases. A composição cromossomal foi avaliada para determinar o efeito das passagens em P5, P10, P15 e P20 de cada tipo celular.

5.7 Avaliação ultraestrutural

Na avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV), as células foram fixadas em temperatura ambiente com fixador Karnovsky (glutaraldeído a 2% + paraformaldeído a 2% + sacarose a 3% + 5mM de CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2). Em seguida, as amostras foram centrifugadas e lavadas duas vezes com tampão cacodilato de sódio a 0,1M. A seguir, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 0,8%, 5 mM de CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, e lavadas duas vezes com tampão e depois em água destilada. O sedimento foi diluído com água destilada e as células espalhadas sobre lamínula coberta com poli-L-lisina. A desidratação foi realizada em uma série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Foi realizada a secagem ao ponto crítico

e em seguida a metalização com ouro, sendo as amostras avaliadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol 700A. Foram avaliadas duas a três amostras dos três tipos celulares criopreservadas em P3 em solução de 10% de DMSO.

5.8 Tratamento das células do cordão umbilical com procaína e tricostatina A

A procaína (P9879-Sigma) foi diluída em água destilada para obtenção de uma solução concentrada a 100 mM, e diluída em DMEM no momento do uso para 1,5mM. As células foram cultivadas em DMEM com procaína a 1,5 mM por dois ciclos de crescimento (até a confluência celular), usadas na rotina de transferência nuclear e monitoradas quanto ao crescimento celular e a morfologia.

A tricostatina A (TSA) (T1952- Sigma) foi diluída em DMSO para preparação de solução estoque a 1 mM e, no momento do uso, foi diluída em meio SOF para 50 nM. O meio SOF com tricostatina A foi usado para preparar a solução de ativação com 6-DMAP utilizada na ativação e no meio de cultivo embrionário. A diluição e uso das soluções foi realizado conforme descrito por Kishigami *et al.* (2006; 2007).

5.9 Transferência nuclear

Os complexos cumulus-oócito (CCO) foram aspirados de ovários de abatedouros e transportados para o laboratório em solução salina (0,9% NaCl) suplementada com penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) a 32°C. Os CCO foram aspirados de folículos de 3 a 8 mm de diâmetro com o auxílio de seringa e agulha 18G e rastreados sob estereomicroscópio (Nikon- SMZ 650) sendo selecionados CCOs com citoplasma homogêneo e mais de três camadas compactas de células do cumulus. Duzentos (200) CCO foram maturados por dia de manipulação. Os CCO foram lavados e transferidos em grupos de 25-30 para gotas de 200 µL de meio de maturação (MIV) composto por TCM 199 com sais de Earle

(Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) e Hepes, suplementado com 10% de SFB, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ piruvato, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ FSH, 12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ LH, 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ L-glutamina, 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ estradiol e penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 18 h em estufa a 38,5°C, 5% de CO_2 em ar e umidade saturada.

Em seguida, os oócitos foram desnudados pela ação de hialuronidase a 0,2% por 5 minutos e repetidas pipetagens. Foram selecionados os oócitos que apresentavam o primeiro corpúsculo polar, que foram então incubados em citocalasina D (2,5 mg/mL) e *Hoescht 33342* (1 mg/mL) diluídos em meio MIV por 7 minutos.

Foram utilizadas as células do animal 3 em todas as micromanipulações. As células do cordão umbilical entre P3 a P10 foram cultivadas até a confluência celular e deixadas por, no mínimo dois, dias para induzir a sincronização do ciclo celular na fase G0/G1. As células foram cultivadas em placa de seis poços, dispersas pela exposição a 1 mL de tripsina a 0,25% e EDTA a 0,1% diluídos em sais de Hanks (Invitrogen) por 5 minutos, e centrifugadas (2000g/5 min). Em seguida, o sedimento foi diluído em 50 μL de meio DMEM, e 25 μL dessa solução foi adicionada a 750 μL de meio de manipulação composto por TCM 199 com sais de Hanks e Hepes suplementado com 10% de SFB, penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

O grupo tratamento 1 (T1) foi reconstruído com células tratadas com procaína, os grupos T2 e T3 foram reconstruídos com células sem tratamento e os três grupos foram comparados com o grupo controle (sem tratamento).

A enucleação e reconstrução foram realizadas em um microscópio invertido (Nikon, Tokyo, Japan) acoplado com dois sistemas de microinjeção hidráulicos e dois sistemas de micromanipulação eletrônicos e iluminação epifluorescente. Estes procedimentos foram realizados em placas com 16 gotas de 20 μL de meio de manipulação contendo um oócito e solução de células. O corpúsculo polar e os cromossomos em metáfase foram removidos

usando uma pipeta de vidro de 30 μm de diâmetro interno e a enucleação foi confirmada pela exposição à luz ultravioleta (UV).

Os oócitos enucleados foram reconstruídos inserindo-se uma única célula no espaço perivitelino. Após a reconstrução, os complexos carioplasto-citoplasma (CCC) foram depositados em meio de eletrofusão (Manitol a 0,3 M) e alinhados manualmente entre dois eletrodos na câmara de eletrofusão (BTX, San Diego, CA, USA), e expostos a dois pulsos elétricos (Pulso: 140 volts, Frequência de alinhamento: 100kHz, tempo do pulso: 20 μs , intervalo entre pulsos: 100, amplitude: 0,7-14 peak volts) emitidos pelo eletrofusor (Sistema de fusão e ativação celular Voltain EP-1). Os CCC foram armazenados na estufa e após 20-30 minutos a taxa de fusão foi avaliada. As estruturas degeneradas foram descartadas e os CCC não fusionados foram submetidos a outro ciclo de fusão. Após a segunda fusão os CCC não fusionados foram descartados.

A ativação foi realizada de 2 a 3 h após o início da fusão para que ocorresse a reprogramação nuclear. Os CCCs do grupo tratamento foram ativados em 5 μM de ionomicina por 5 min seguidos de 4 h em 1,9 mM de 6-demetilaminopurina (6-DMAP) com 50 nM de TSA diluídos em meio de cultivo (SOF) e em seguida foram colocados no SOF com 50 nM de TSA por 20 h, grupo tratamento 2, (T2) e por 16 h, grupo tratamento 3, (T3). Após esse período foram cultivados em SOF suplementado com 5% de SFB com co-cultura de células do cumulus até o sétimo dia. Os CCCs do grupo controle foram ativados em 5 μM de ionomicina por 5 min seguidos de 4 h em 6-DMAP diluído em meio SOF e após esse período foram cultivadas em SOF suplementado com 5% de SFB com co-cultura de células do cumulus por sete dias. A taxa de clivagem foi avaliada no segundo dia e a taxa de blastocisto foi avaliada no sétimo e oitavo dias (Figura 3).

A micromanipulação foi realizada somente utilizando-se as células do cordão umbilical por ter apresentado melhores resultados nas avaliações de qualidade celular. Foram realizadas

quatro repetições de TN para cada tratamento, perfazendo, aproximadamente, 200 estruturas reconstruídas para cada grupo. O grupo T1 foi composto de duas rotinas de manipulação perfazendo, aproximadamente, 100 oócitos reconstruídos. O grupo partenogenético - oócitos ativados para verificar se o sistema está funcionando- por 10 oócitos ativados por dia de manipulação. Foram intercaladas manipulações dos grupos tratamento com o grupo controle para uniformizar os resultados.

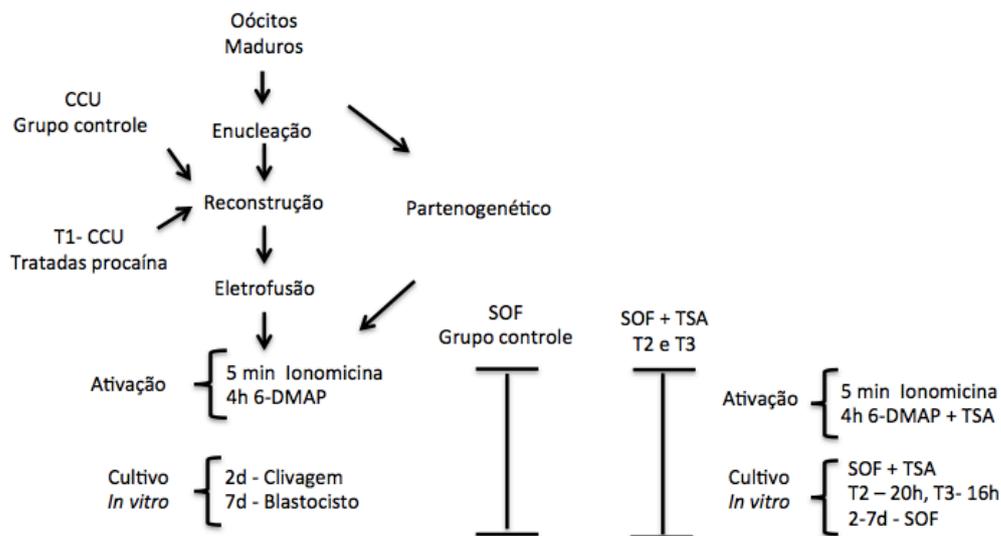


Figura 3. Desenho experimental da transferência nuclear.

5.10 Análise estatística

O delineamento experimental realizado foi inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. Para as variáveis em formato de porcentagens, foi realizada a transformação “arco seno raiz ($x/100$)”. Estas transformações são necessárias para fins de promover a normalidade dos dados. A verificação estatística da significância dos tratamentos foi feita pela Análise de Variância (ANOVA). Para a comparação das médias, foi utilizado o teste de Tukey ao nível de probabilidade de 5%. Todas as análises foram realizadas pelo software estatístico *SAS versão 9.1.2*.

6. RESULTADOS

6.1 Isolamento e cultivo de células do fluido amniótico e do cordão umbilical

As células do cordão umbilical apresentaram crescimento mais estável durante todo o cultivo, não demonstraram alterações morfológicas expressivas e nem se tornaram senescentes, como pode ser observado nas figuras 4E-H. As CCU demoraram menos de 24 h para aderir ao fundo da placa de petri e levaram em média dois dias para atingir a primeira confluência (P1). As CCU apresentam morfologia semelhante à das CFO (Figuras 4A–D). Estas células apresentaram tempo médio de crescimento até a vigésima passagem (P20) do cultivo de 109,89 dias, com tempo médio entre passagens de $5,49 \pm 2,37$ dias. As CCU, ainda, apresentaram melhores resultados quando cultivadas com meio DMEM suplementado com 15% de SFB, 2% de solução de vitaminas, 2% de solução de aminoácidos e antibióticos (dados não apresentados).

Dos três fetos em que foram coletadas células do fluido amniótico, apenas um apresentou crescimento celular estável até a vigésima passagem. As CFA contaminaram-se com mais facilidade do que os outros dois tipos celulares e muitas amostras foram perdidas. Logo após a coleta do líquido amniótico, as células se apresentaram morfológicamente arredondadas, com tamanho pequeno e uniforme entre todas as células (Figura 4I-J).

As CFA demoraram cerca de 48-72 h para aderir ao fundo da garrafa de cultivo, levando em média 15 dias para atingir a primeira confluência (P1). Após a aderência, as células adquiriram formato fusiforme semelhante ao de fibroblastos (4J), porém maiores (4K) e com núcleo grande (4L) em relação às CFO (Figura 4C-4D). As CFA apresentaram cinética de crescimento lenta quando cultivadas em garrafas de cultivo com tempo médio entre passagens de 12 dias. O cultivo foi otimizado reduzindo a área nas placas de seis poços (dados não apresentados). As CFA apresentaram tempo médio para atingir a vigésima passagem do cultivo

de 124 dias, com tempo médio entre passagens de $6,2 \pm 3,6$ dias (Figura 5). Algumas placas das CFA apresentaram mudanças na morfologia durante o cultivo, principalmente após a décima quinta passagem.

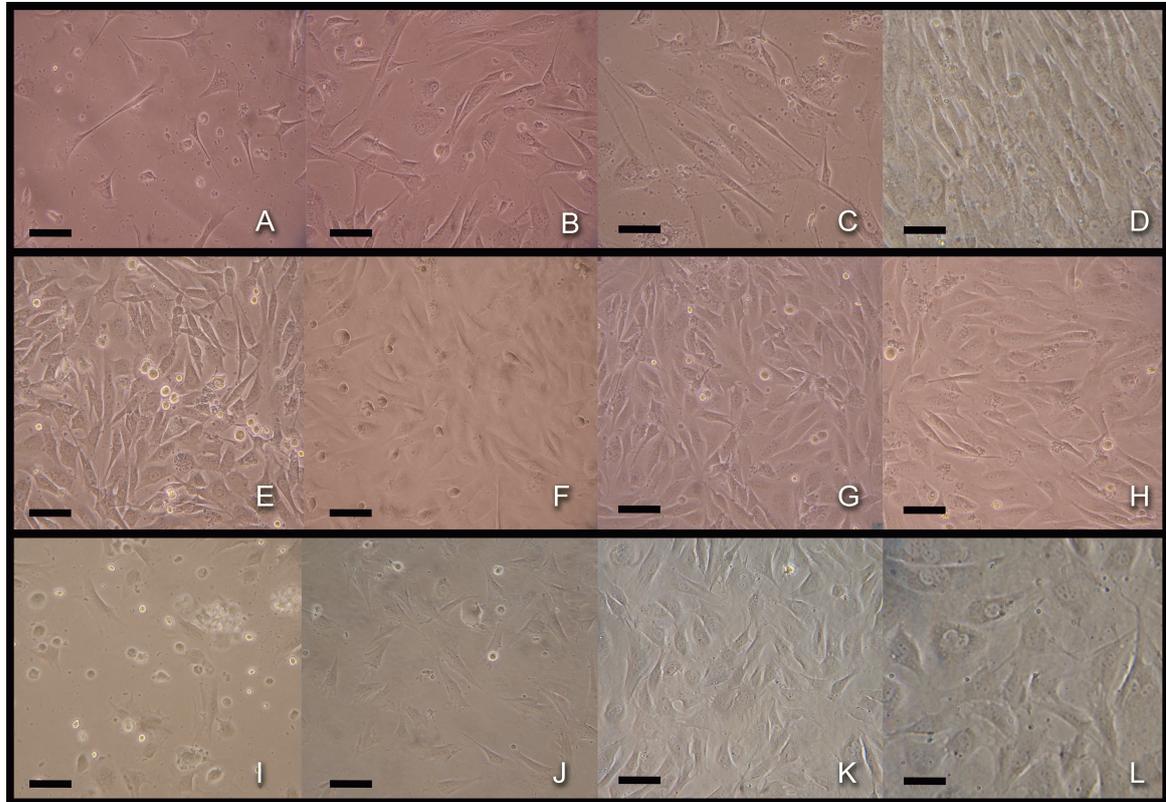


Figura 4. Fotomicrografias da morfologia dos três tipos celulares em cultivo durante as passagens (P5 – P20): fibroblasto da orelha com morfologia típica de fibroblastos em P5 (A), P10 (B), P15 (C) e P20 (D); células do cordão umbilical com morfologia semelhante aos fibroblastos em P5 (E), P10 (F), P15 (G) e P20 (H); células do fluido amniótico, em P5 (I), P10 (J), P15 (K) e P20 (L) com formato fusiforme, células maiores (K) e núcleo grande (L) em relação às CFO. Barra de escala = 50 μ m

Os fibroblastos isolados da orelha apresentaram crescimento estável e sem diferenças morfológicas entre passagens, como mostram as figuras 4A-D. Estas células apresentaram uma média de 110,25 dias para atingirem a vigésima passagem (P20) do cultivo celular, demorando $5,51 \pm 2,37$ dias entre as passagens (Figura 5). Não houve diferença estatística no tempo médio de crescimento entre passagens de P1 até P20 entre os três tipos celulares.

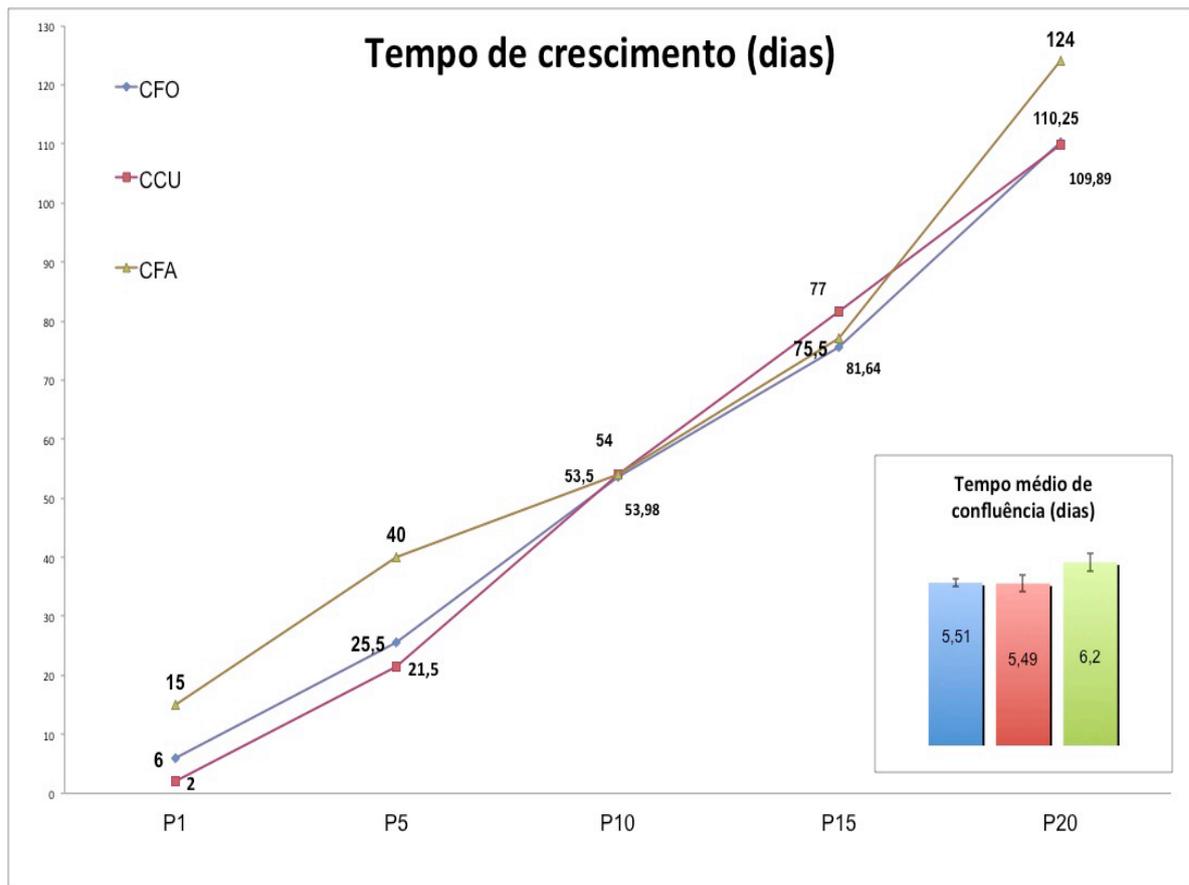


Figura 5. Diferenças no tempo de crescimento em dias durante as passagens P1, P5, P10, P15 e P20 e tempo médio de crescimento ao longo das passagens (P1 a P20) em dias de confluência comparando fibroblastos da orelha (CFO) com células do cordão umbilical (CCU) e células do fluido amniótico (CFA).

6.2 Comparação entre crioprotetores

As soluções com 10% de DMSO garantiram viabilidade celular de $90,33 \pm 5,58\%$, $90,56 \pm 4,40\%$ e $81,90 \pm 3,31\%$ para CFO, CCU e CFA, respectivamente, sendo significativamente mais eficiente e com menor variação para preservação que as outras soluções (Tabela 2).

As soluções com 5% de DMF garantiram a viabilidade de $66,51 \pm 22,37\%$, $28,86 \pm 13,31\%$ e $35,48 \pm 17,55\%$ para as CFO, CCU e CFA, respectivamente. As soluções com 7% de glicerol apresentaram a viabilidade celular de $56,56 \pm 14,70\%$, $44,38 \pm 13,15\%$ e $43,20 \pm 14,89\%$ para as

CFO, CCU e CFA, respectivamente. Não houve diferenças estatísticas entre os meios de criopreservação com 5% de DMF e 7% de glicerol.

Considerando a viabilidade média de todos os tipos celulares, a solução com 10% de DMSO foi significativamente superior aos outros tratamentos, preservando $87,6 \pm 5,94\%$ das células. Não houve diferenças na eficiência de preservação celular das soluções com 5% de DMF e 7% de Glicerol (Tabela 2). Como foi identificado que a solução crioprotetora com 10% de DMSO foi mais eficiente em preservar os três tipos celulares, a partir deste momento, os tipos celulares foram criopreservados somente nessa solução para proceder as demais avaliações.

Tabela 2. Comparação da viabilidade celular (média e desvio padrão) pós-descongelação em P3 comparando três crioprotetores diferentes (10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 5% de dimetilformamida (DMF) e 7% de glicerol (GLI) por azul de trypan a 0,4% comparando células de fibroblastos da orelha (CFO) com células do cordão umbilical (CCU) e células do fluido amniótico (CFA).

	10% DMSO (%)	5% DMF (%)	7% GLI (%)
CFO	$90,33 \pm 5,58^a$	$66,51 \pm 22,37^b$	$56,56 \pm 14,70^b$
CCU	$90,56 \pm 4,40^a$	$28,86 \pm 13,31^b$	$44,38 \pm 13,15^b$
CFA	$81,90 \pm 3,31^a$	$35,48 \pm 17,55^b$	$43,20 \pm 14,89^b$
Média	$87,6 \pm 5,94^A$	$43,62 \pm 23,98^B$	$48,05 \pm 14,78^B$

(Aa≠Bb nas linhas indicam diferença significativa entre os tratamentos para $P < 0,05$)

6.3 Avaliação do efeito das passagens celulares

A viabilidade celular entre passagens foi realizada pelo corante azul de trypan a 0,4% e apresentou os resultados demonstrados na tabela 3. Não houve diferença entre passagens para as CFO e CCU, enquanto as CFA apresentaram variações significativas entre as passagens. As CFA apresentam viabilidade significativamente baixa em P20 ($17,2 \pm 8,87\%$) quando comparadas às outras passagens do mesmo tipo celular. Quando os efeitos das passagens

foram comparados aos outros tipos celulares, as CFA também apresentaram média de viabilidade significativamente inferior às CFO e CCU.

Tabela 3. Comparação da viabilidade celular (média e desvio padrão) pós-descongelamento ao longo das passagens (P5, P10, P15 e P20) avaliado por azul de trypan a 0,4% comparando células de fibroblastos da orelha (CFO), do cordão umbilical (CCU) e do fluido amniótico (CFA).

	P5	P10	P15	P20	Média
CFO (%)	84,4 ± 6,87	73,4 ± 11,01	85,8 ± 3,96	77 ± 2,91	80,15 ± 8,26 ^A
CCU (%)	79,2 ± 5,07	67,6 ± 11,45	71,7 ± 24,31	58,6 ± 32,53	69,27 ± 20,94 ^A
CFA (%)	63,2 ± 2,68 ^{ab}	71,8 ± 9,91 ^a	53,6 ± 11,78 ^b	17,2 ± 8,87 ^c	51,4 ± 22,87 ^B
Média (%)	75,6 ± 11,49 ^A	70,93 ± 10,32 ^A	70,36 ± 19,97 ^A	50,93 ± 31,58 ^B	

(Aa≠Bb indicam diferença significativa entre os tratamentos para P<0,05)

A avaliação de fragmentação do DNA (TUNEL) comparando o efeito das passagens e dos tipos celulares não apresentou diferença (Figura 6). Foi possível observar células do cordão umbilical com DNA íntegro ou fragmentado corados pelo *Hoescht* (Figura 7A-B) e célula com DNA fragmentado que foi corado em verde pelo corante isocianato de fluoresceína (Figura 7C).

Para as análises de composição cromossomal por citogenética, foram avaliadas dez metáfases de cada passagem dos três tipos celulares. O cariótipo encontrado foi de macho (XY), todas as metáfases observadas apresentaram ploidia normal e estrutura normal, os cromossomos observados eram acrocêntricos, com exceção do par sexual (Figura 8).

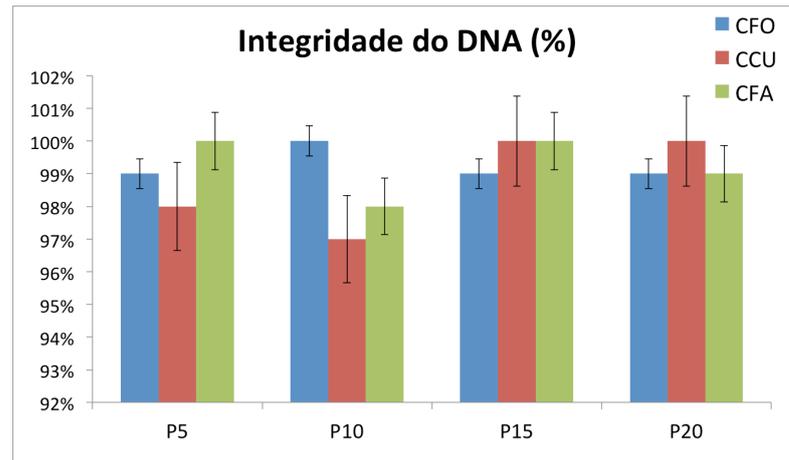


Figura 6. Células com DNA íntegro (% - médias) no teste de fragmentação de DNA pelo TUNEL comparando células: de fibroblastos da orelha (CFO); do cordão umbilical (CCU) e do fluido amniótico (CFA).

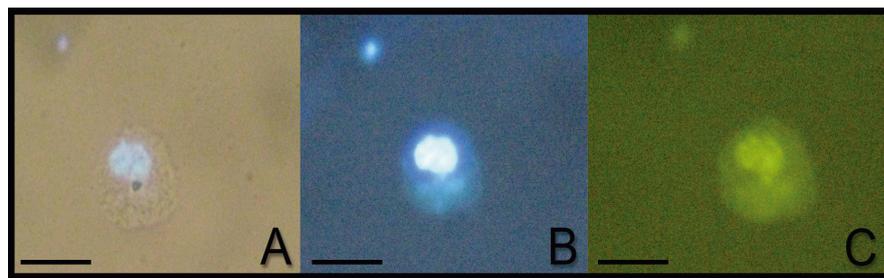


Figura 7. Fotomicrografias de células do cordão umbilical (CCU) submetidas à avaliação da fragmentação do DNA pelo método do TUNEL. Campo claro (A), DNA corado com *Hoescht* (B) e DNA fragmentado corado com isocianato de fluoresceína (C). Barra de escala = 25 μ m

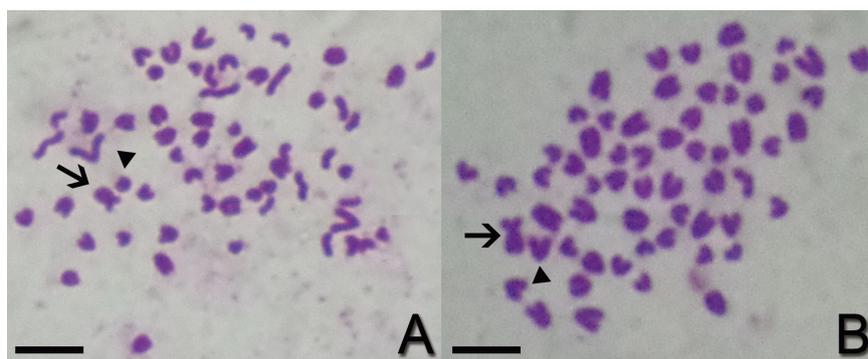


Figura 8. Cariótipo normal de macho com 60 cromossomos (XY): Cariótipo de células de fibroblastos da orelha em P10 (A) e células do cordão umbilical em P10 (B). Seta – cromossomo X e cabeça de seta- cromossomo Y. Barra de escala= 25 μ m

6.5 Avaliação ultraestrutural em Microscopia Eletrônica de Varredura

Na avaliação de microscopia eletrônica de varredura foi possível verificar que CFO apresentaram formato arredondado (Figura 9A) com vilosidades (Figura 9C) e sem deformidades na estrutura da membrana (Figura 9B e 9C). As CFA apresentaram formato pleomórfico (Figura 9D e 9E) com presença de vilosidades (Figura 9F), irregularidades e aspecto deformado em algumas regiões (Figura 9E). As CCU apresentaram formato arredondado (Figura 9G) sem vilosidades na estrutura (Figura 9I) e com irregularidades (Figura 9H).

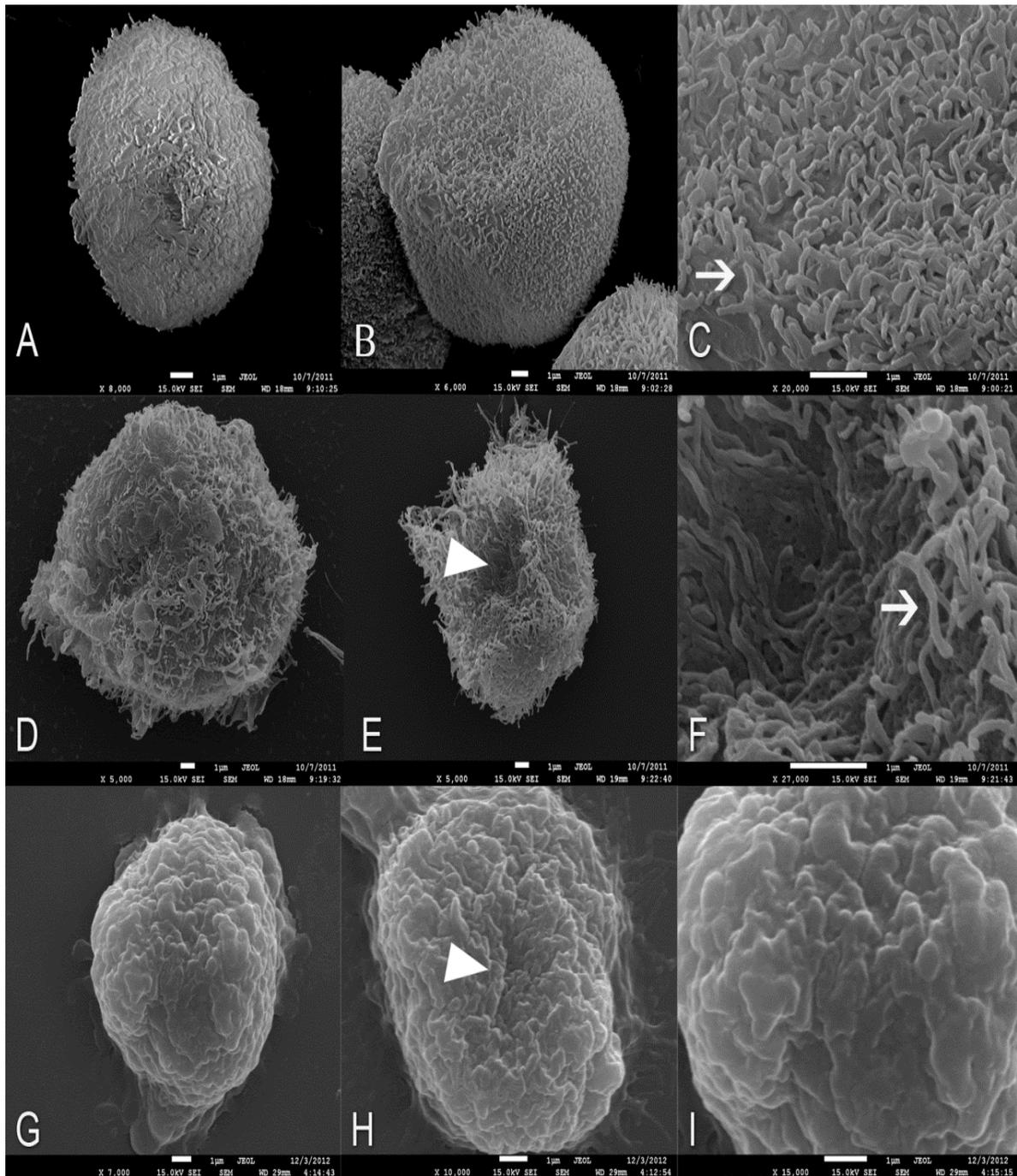


Figura 9. Avaliação ultraestrutural dos três tipos celulares em P3 congelados em 10% de DMSO: Células de fibroblastos da orelha com formato arredondado (A), sem deformidades na estrutura (B) e com pequenas vilosidades na superfície indicadas pela seta (C). Células do fluido amniótico com formato pleomórfico (D), irregulares e aspecto deformado (cabeça de seta- E) e com presença de vilosidades (seta). Células do cordão umbilical com formato arredondado (G), irregularidades na superfície (cabeça de seta) (H) e sem vilosidades na estrutura (I). Barra de escala = 1 μ m.

6.6 Produção de embriões por transferência nuclear

As células do cordão umbilical foram tratadas com procaína 1,5mM por dois ciclos de crescimento celular e após o segundo ciclo de tratamento, as células sofreram alteração de morfologia apresentando vacúolos grandes e pararam o crescimento como demonstrado na figura 10. No procedimento de TN realizado no primeiro ciclo de tratamento, foram reconstruídas 65 estruturas com as células tratadas, com 45 estruturas fusionas (69,89%) estas apresentaram baixa taxa de clivagem, 13 estruturas (28,88%), baixa produção embrionária, dois blastocistos (4,4%).

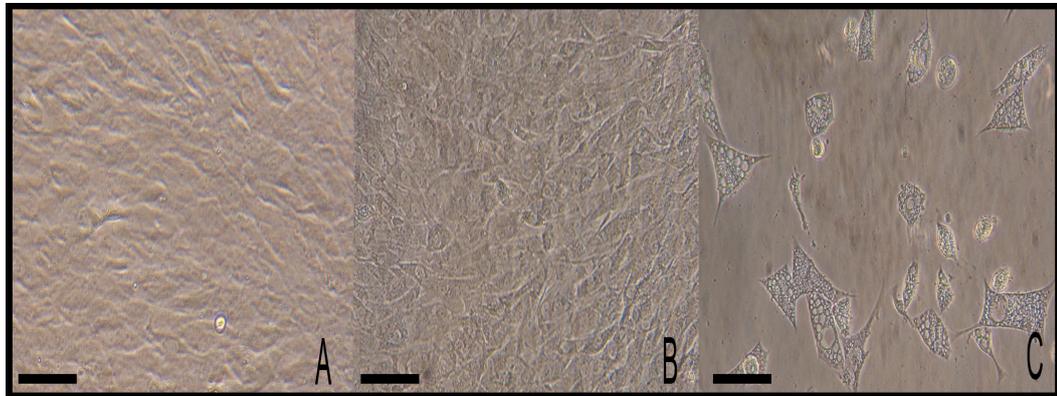


Figura 10. Células do cordão umbilical: sem tratamento com morfologia normal (A), tratadas com procaína no primeiro ciclo e com morfologia normal (B); tratadas com procaína no segundo ciclo celular apresentando alteração na morfologia com presença de vacúolos e sem crescimento (C). Barra de escala = 25 μ m.

As quantidades de estruturas reconstruídas, fusionadas, clivadas e que se desenvolveram em blastocisto tratadas com TSA e grupo controle (sem tratamento), estão descritas na tabela 4. Não houve diferença entre tratamentos nas taxas de reconstrução e eletrofusão (Figura 11). Para a taxa de clivagem o tratamento por 20 h não diferiu do controle e ambos foram superiores ao tratamento por 24 h (tabela 4).

Tabela 4. Quantidade e taxas de estruturas reconstruídas, fusionadas/cultivadas, clivadas e blastocistos provenientes de oócitos reconstruídos com CCU tratados com TSA por 4 h na ativação e 16 h no cultivo embrionário; TSA por 4 h na ativação e 20 h no cultivo embrionário e grupo controle (sem tratamento).

Tratamento		Reconstruídas	Fusionadas / Cultivadas	Clivadas	Blastocisto
TSA 20h	Total	202	121	57	20
	Taxa (%)	80,95	59,17	49,46 ^a	17,19 ^a
TSA 24h	Total	164	91	22	4
	Taxa (%)	72,99	63,64	22,55 ^b	4,50 ^b
Controle	Total	175	101	40	20
	Taxa (%)	77,99	62,22	41,81 ^a	21,73 ^a

(Aa≠Bb indicam diferença significativa entre os tratamentos para P<0,05)

As células do cordão umbilical foram eficientes em produzir embriões por transferência nuclear apresentando 21,73% de blastocisto em relação ao total de cultivados. Na taxa de produção de blastocisto o tratamento por 20 h foi igual ao grupo controle e os dois foram superiores ao tratamento com TSA por 24 h.

O controle partenogênético foi feito para verificar a eficiência do sistema de ativação e cultivo embrionário. Foram ativados 111 oócitos sendo que 79 estruturas clivaram (63,96%) e 30 formaram blastocistos (27,02%). Os valores não foram comparados aos tratamentos na análise estatística.

7. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou ser possível isolar, cultivar e criopreservar células do fluido amniótico e cordão umbilical de forma eficiente para formar um criobanco de células que possam ser usadas na técnica de clonagem por transferência nuclear (TN). Porém ficou evidente que há diferenças morfológicas entre os tipos celulares, na sensibilidade ao número de passagens e ao crioprotetor utilizado para preservação em nitrogênio líquido.

Também foi possível estabelecer o cultivo das CFA e CCU sendo que as CFA só foram estáveis até a P15. As CFA tiveram tempo de crescimento mais lento e foram mais sensíveis a criopreservação em relação as CFO. Como as CFA são formadas por uma população heterogênea de células torna-se mais difícil o isolamento de apenas uma linhagem celular, sendo que algumas dessas subpopulações celulares do fluido amniótico não devem ser estáveis em cultivo *in vitro* ou não apresentam crescimento em meio Amniomax que foi utilizado nesse trabalho.

Logo após a coleta, as CFA apresentavam-se esféricas e de tamanhos variáveis, sofrendo aderência no fundo da placa de petri após 48-72 h de cultivo. Dev e colaboradores (2012b) relataram resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho, porém no cultivo de células do fluido amniótico de búfalos. Estes pesquisadores descreveram que após seis dias de cultivo foram encontradas células em formato estrelar, esféricas sem núcleo, esféricas com núcleo, pentagonais e células redondas sem aderir provenientes da mesma amostra de fluido amniótico. Inicialmente, as células demoraram em média duas semanas para atingir de 70 a 80% de confluência, e ao longo das passagens atingiram de 90 a 100% de confluência em seis dias, semelhante aos dados desse experimento.

As CCU foram estáveis até P20 e foram semelhantes às CFO, que é uma célula de crescimento rápido, estável e sem diferenciação *in vitro*. As CCU possuem cinética de crescimento semelhante as CFO, essas aderiram a placa de cultivo em menos de 24 h de cultivo

e apresentaram confluência em 48 h nas passagens iniciais. As CCU são provenientes do cordão umbilical composto pela veia e artéria umbilical; matriz perivascular e geléia de Wharton. Possivelmente a população predominante sejam fibroblastos que formam a veia e artéria umbilical.

Um dos pontos cruciais para o êxito da TN é o sucesso na criopreservação das células doadoras, porém pouca importância tem se dado a este efeito no processo de fusão e posterior desenvolvimento do embrião. O crioprotetor e a curva de congelação são os fatores que mais influenciam na sobrevivência da célula após a descongelação (Hayes, *et al.*, 2005). Uma etapa crítica no processo de congelação é a taxa de resfriamento, e para evitar falhas no processo de congelação é preciso escolher uma curva de congelação ideal combinada a um crioprotetor eficiente.

A redução progressiva da temperatura e a vitrificação são dois métodos eficientes para a criopreservação celular. Nos três tipos celulares estudados a criopreservação por redução progressiva de temperatura em curva não controlada foi eficaz quando combinada com soluções com 10% de DMSO. Esta solução crioprotetora foi mais eficiente na preservação da viabilidade celular e com menor variação nos três tipos celulares, sendo possível restabelecer o cultivo normal após o processo de descongelação em todos os tipos celulares. Estas informações confirmam os achados de Miranda-Sayago e colaboradores (2012) que demonstraram que o uso da redução progressiva de temperatura e o crioprotetor DMSO para a criopreservação de células é um método simples, barato, que pode ser facilmente implementado nos laboratórios e que não alterou as características celulares pós-descongelação. Estes autores observaram que células do fluido amniótico humano criopreservadas em P3 restabeleceram o cultivo normal pós-descongelação, e apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos até P22 quando a morfologia mudou para irregular e

plana, no presente trabalho as células mudaram de morfologia após a P15 mesmo sem terem sido congeladas.

O período de cultivo é um dos gargalos da TN e da transgenia, pois pode desestabilizar os eventos biológicos subsequentes ao processo, prejudicando e até interrompendo o desenvolvimento embrionário. Os problemas relacionados com o longo cultivo são instabilidade cromossômica e encurtamento do telômero, que favorecem a perda da função de genes importantes para o desenvolvimento (Merighe *et al.*, 2010).

A viabilidade das CCU foi estável ao longo do cultivo celular tendo resultados semelhantes as CFO, que foram mais estáveis na criopreservação, enquanto as CCU apresentam viabilidades próximas a 60% em todas as passagens, mesmo apresentando uma variação maior em relação as CFO. As CFA foram mais sensíveis a criopreservação quando comparadas com os outros tipos celulares, mas apresentaram uma viabilidade satisfatória até P15 tendo a viabilidade diminuída ao atingir P20. A redução progressiva de temperatura em curva não controlada não é um sistema homogêneo, promovendo um alto coeficiente de variação entre as palhetas.

Filioli Uranio *et al.* (2011) relataram o cultivo de células do fluido amniótico e da matriz do cordão umbilical de cachorros até P11 demonstrando que viabilidade não se alterou ao longo das passagens. Zuconi *et al.* (2010) reportaram o cultivo por sete passagens das veias do cordão umbilical sem alterar a morfologia e a capacidade de proliferação.

O DNA celular pode ser lesado durante os processos de criopreservação e liofilização, o que é causado pela ativação de nucleases endógenas (Martins *et al.*, 2007). No entanto, neste estudo não foi observado fragmentação significativa do núcleo nos três tipos celulares após a criopreservação e nem ao longo das passagens do cultivo *in vitro*, demonstrado que o DNA não sofreu influência negativa do cultivo prolongado e da criopreservação. Durante o ciclo celular o DNA é replicado, reorganizado em cromossomos mitóticos e descondensado em cromatina

na interfase. Dentro da célula a cromatina é organizada em heterocromatina e eucromatina, refletindo os estados ativo e inativo do DNA (Ward, 1994).

As células foram criopreservadas quando atingiram o estado de confluência celular, e possivelmente a maioria estava na fase G₀ do ciclo celular, período em que o DNA está em heterocromatina. Fato que poderia facilitar a ocorrência da fragmentação nuclear. Mesmo assim a criopreservação e o cultivo *in vitro* prolongado não causaram danos ao DNA das células. De acordo com Ward *et al.* (1994), a estrutura terciária do DNA que forma o genoma dos eucariotos é plástica e assume diferentes formas em resposta às necessidades celulares. Este fato talvez explique a adaptação das células deste experimento frente aos desafios impostos pela criopreservação e cultivo prolongado.

É possível que o cariótipo sofra mudanças durante as passagens do cultivo *in vitro* e aumente as taxas de anormalidades cromossômicas, por esta razão, foi realizada a avaliação citogenética nas passagens celulares. Todas as metáfases observadas nos três tipos celulares e ao longo das passagens apresentaram número e estrutura normal, demonstrando que o cultivo *in vitro* prolongado e a criopreservação não alteram a organização e estabilidade dos cromossomos. O cariótipo masculino encontrando confirma que as células tem a mesma origem.

Estas informações confirmam outros achados em diferentes espécies Filioli Uranio *et al.* (2011) reportaram o cariótipo normal em P4 de CFA e CCU de cães. Zucconi *et al.* (2010) relataram o crescimento de células da veia do cordão umbilical em cães até P7 com cariótipo normal. De Coppi *et al.* (2007) relataram o cultivo de CFA humanas por 250 passagens em placa de 96 poços com crescimento homogêneo, sem alterações no cariótipo e no tamanho dos telômeros. Os achados de Dev *et al.* (2012b) também corroboram com esses dados, demonstrando que as células do fluido amniótico de búfalos cultivadas apresentaram cariótipo normal, sem anormalidades genômicas aparentes, não sendo observadas fragmentações de

micronúcleo e cromossomal.

Para o uso na transferência nuclear, a baixa viabilidade das CFA, criopreservadas na vigésima passagem do cultivo, pode não influenciar na eficiência da técnica, pois conforme demonstrado, o núcleo permanece íntegro e a ploidia permanece normal ao longo das passagens, o que seria suficiente para a reprogramação nuclear, pois a maquinaria celular é doada pelo oócito e a célula doadora fornece apenas o núcleo.

Sendo assim, este trabalho buscou uniformizar os resultados usando apenas fetos de machos. Em estudo desenvolvido por Merighe *et al.* (2010), o uso de células somáticas masculinas determinou uma maior taxa de formação de blastocisto clonados, maior taxa de desenvolvimento a termo e maior taxa de sobrevivência de bezerros. Esta diferença está relacionada à capacidade desses embriões em suportar o estresse durante os primeiros estádios do desenvolvimento. O desequilíbrio entre os gêneros pode ser atribuído à quantidade desproporcional de transcritos ligados ao cromossomo X em fêmeas, uma vez que o processo de inativação de um dos cromossomos X deveria resultar numa equivalência funcional com os machos, porém falhas neste processo acarretam perdas embrionárias.

Merighe e colaboradores (2010) relataram taxas maiores de clivagem, desenvolvimento até oito células e blastocisto em embriões reconstituídos com células de passagens iniciais e intermediárias. Em contraste, Kubota *et al.* (2000) relataram o nascimento de seis vacas clonadas de fibroblastos da pele cultivados por longo-período (10 a 15 passagens). Estas foram mais eficientes que as células cultivadas por curto período (5 passagens) em relação a taxa de blastocisto e de prenhez. A razão de células cultivadas por mais tempo serem mais eficientes possivelmente se deve ao fato de que nas passagens iniciais existe uma população heterogênea de células.

Na avaliação de MEV foi possível caracterizar, diferenciar os três tipos celulares.. Confirmando os achados da avaliação de viabilidade celular, as células do fluido amniótico

foram as mais prejudicadas na criopreservação, mostrando deformidades na superfície celular com depressões e regiões irregulares, provavelmente devido ao efeito da criopreservação e do crioprotetor. Já as CCU não possuem vilosidades na superfície e algumas células estavam irregulares, possivelmente devido ao efeito da criopreservação. Já as CFO foram mais estáveis aos efeitos da criopreservação apresentando formato regular.

Dev e colaboradores (2012a) relataram que as CFA de búfalos apresentam formato pleomórfico incluindo diferentes tamanhos e formas, mas nos frascos de cultura a forma semelhante a fibroblastos predominou. Na microscopia de varredura foi relatada presença de células pentagonais, redondas, formato de estrela e com células em divisão.

Após a reavaliação da primeira etapa do trabalho, observou-se que as células do cordão umbilical foram mais resistentes ao cultivo *in vitro* por 20 passagens que as células do fluido amniótico, e apresentaram comportamento semelhante aos fibroblastos da orelha. As CCU foram menos sensíveis à criopreservação, apresentando viabilidade adequada, baixa fragmentação do DNA, estabilidade cromossomal, sem alterações na morfologia celular e poucos danos ultraestruturais. Desta forma, as CCU foram escolhidas para serem usadas na transferência nuclear e submetidas aos diferentes tratamentos com procaína e TSA visando aumentar a eficiência da reprogramação nuclear.

Apenas um pequeno grupo de tipos celulares foi testado na transferência nuclear e ainda não se descobriu qual tipo celular é o que apresenta melhores resultados como doador de núcleo (Kato *et al.*, 2000) demonstrando então a importância de testar novos tipos celulares, tais como as células do cordão umbilical.

As células do cordão umbilical cresceram normalmente no primeiro ciclo de confluência celular com o uso da procaína, porém no segundo ciclo verificou-se que a substância foi tóxica para as células do cordão umbilical na concentração testada de 1,5mM. Uma vez que o tratamento provocou mudanças na morfologia, no crescimento celular e apresentou baixas

taxas de produção embrionária em relação ao grupo controle, decidiu-se não usar CCU tratadas com 1,5mM de procaína como doadoras de núcleo. Este foi o primeiro experimento utilizando procaína no cultivo celular de células do cordão umbilical de bovinos. Em bovinos, a procaína foi utilizada no cultivo celular de fibroblastos nas concentrações de 0,1mM e 0,5mM e as células apresentaram morfologia normal, porém não apresentaram alteração no padrão de metilação na DMR do gene XIST. Na concentração de 2mM também ocorreram mudanças morfológicas e muitos vacúolos no espaço intracelular, semelhante ao encontrado neste experimento (Lacerda, 2010). Outro trabalho realizado em linhagem celular cancerosa de humanos MCF7 mostrou que a concentração de 2mM não apresentou crescimento normal em relação ao controle. Neste mesmo trabalho, a suplementação com 1mM de procaína apresentou uma diminuição de aproximadamente 40% em relação ao grupo controle durante o período de 72h (Villar-Garea, 2005 *apud* Lacerda, 2010).

Resultados semelhantes foram encontrados por Tada e colaboradores (2007) usando 1mM de procaína em células HLE por cinco dias. Os autores relataram que a procaína induz a formação de vacúolos nas células, os quais são capazes de alterar as características de superfície de membrana. O tratamento das linhagens celulares HLE e HuH7 com 2mM também apresentou diminuição no crescimento celular, mas a linhagem de hepatócitos primários não sofreu alteração. Atualmente, objetiva-se desenvolver protocolos que visem proteger o genoma de possíveis efeitos danosos durante o cultivo celular *in vitro*. No caso da transferência nuclear, submeter a célula doadora de núcleo a um tratamento para sofrer uma desprogramação epigenética antes da clonagem pode aumentar a eficiência da técnica.

A procaína não precisa de uma replicação do DNA para começar a inibir as DNMTs, já que é uma molécula não nucleosídica, não sendo incorporada ao material genético. Esta característica resulta numa ação mais rápida do que drogas análogas de nucleotídeos como 5-aza-2-deoxicitidina. Acredita-se que a procaína, desmetilando o genoma do núcleo doador, seja

capaz de facilitar a reprogramação epigenética. No entanto existem outras vias bioquímicas que a procaína pode alterar para causar a desmetilação do DNA, mas que não são conhecidas. O que se tem conhecimento é que a procaína é um bloqueador de canais iônicos, mas ainda não existem estudos relacionando as vias bioquímicas inibindo as DNMTs (Lacerda, 2010).

Este trabalho buscou usar uma concentração intermediária da que foi testada em fibroblastos bovinos por Lacerda (2010), porém essa concentração também foi ineficiente em células do cordão umbilical. São necessários mais estudos para testar outras concentrações e tempos de cultivo celular com a procaína.

Um novo experimento foi proposto utilizando a tricostatina A na ativação e cultivo de embriões reconstruídos com CCU por TN. Vários trabalhos foram publicados em diferentes espécies mostrando o efeito positivo na produção embrionária e no período pós-implantacional.

Neste experimento, as taxas de reconstrução e eletrofusão não apresentaram diferença entre os grupos. Como houve um padrão na realização da enucleação, reconstrução com o mesmo tipo celular, não eram esperadas variações nestes parâmetros. Kato e colaboradores (2000) trabalhando com diferentes tipos celulares provenientes de machos, fêmeas, adultos e fetos relataram taxas de eletrofusão variando entre 55 a 89%, variação que pode ter ocorrido por diferentes fatores além do tipo celular.

Um trabalho conduzido por Mello e colaboradores (2003) usando fibroblastos fetais provenientes de biópsias realizadas em feto após a retirada da cabeça e órgãos internos, cultivadas e sincronizadas por soro-privação, apresentou dados semelhantes aos da produção embrionária com células do cordão umbilical deste estudo, sendo que de 191 estruturas reconstruídas 83 (43,5%) fusionaram e 24 (28,9%) desenvolveram em blastocistos.

Neste estudo, o tratamento com TSA por 4 h na ativação seguidas de 20 h no cultivo embrionário (24h de exposição) apresentou taxas de clivagem e de blastocistos inferiores ao grupo controle. A taxa de blastocistos foi extremamente baixa, indicando um efeito negativo

deste período de exposição às estruturas embrionárias e influenciando a primeira clivagem. Semelhante a esse trabalho, Akagi *et al.* (2011) usaram a TSA por 20 h no cultivo embrionário e relataram aumento na produção embrionária porém o tratamento não foi realizado na ativação e foi utilizada a concentração de 5 nM. Em embriões suínos clonados por *handmade* usando fibroblastos fetais tratados com 37,5 nM TSA por 24 h após a ativação, observou-se o aumento da taxa de blastocisto e do nascimento a termo (Li *et al.*, 2008).

Contrariamente, o tratamento usando 4 h na ativação seguidas de 16 h no cultivo embrionário (20 h de exposição) com TSA, demonstrou taxas de clivagens e blastocistos superiores ao tratamento com exposição mais prolongada ao TSA. Porém, não houve diferenças estatísticas com o grupo controle. A concentração de 50 nM de tricostatina A por 20 h foi viável na ativação e cultivo de embriões bovinos reconstruídos com células do cordão umbilical produzindo embriões de maneira eficiente, apesar de ser estatisticamente igual ao grupo controle.

O uso do TSA tem apresentado resultados bastante divergentes nas diferentes espécies, necessitando de definição de uma concentração e tempo ideal para aumentar a eficiência na TN em bovinos. Kishigami *et al.* (2006) compararam em embriões de ratos reconstruídos com células do *cummulus* em diferentes tempos de exposição a TSA (6, 10, 14 e 20 h) sendo que todos aumentaram a produção de embriões mas o grupo com 10 h teve a maior produção embrionária. No mesmo trabalho a concentração de 5 nM aumentou a produção de embriões em relação aos grupos controle e com 50 nM. Esse trabalho demonstrou que em ratos a hipermetilação do DNA ocorre até 10 h após a ativação.

Porém, outro trabalho tratou com 50 nM de TSA embriões bovinos clonados reconstruídos com fibroblastos por 4 h na ativação seguidas de 9 h no cultivo embrionário, o que levou ao aumento da acetilação da H3K9 e a metilação das citosinas, porém não

influenciou as taxas de clivagem e de blastocisto, e não foram observados efeitos pré e pós implantacional (Sangalli *et al.*, 2012).

Vários trabalhos relataram aumento da taxa de blastocisto ao usar TSA por diferentes tempos: 20 h (Akagi *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011), 14 h (Sawai *et al.*, 2012) e por 10 h (Srirattana *et al.*, 2012). No presente estudo o uso da TSA por 24 h foi prejudicial ao desenvolvimento embrionário e é possível especular que a hipermetilação do DNA em bovinos deve ocorrer entre 10 a 20 h sendo necessário encontrar o tempo ideal para aumentar a produção embrionária com o tratamento por TSA.

Lee *et al.* (2011) testaram diferentes concentrações de TSA por 3 h na ativação seguidas de 7 h no cultivo em embriões bovinos reconstruídos com células da orelha, e observaram que a concentração de 50nM aumentou em 24% a produção de embriões. Em seguida, os autores testaram essa concentração por diferentes tempos, e encontraram que 3 h na ativação seguidas de 17 h no cultivo aumentou 35% a produção de embriões em relação ao grupo controle.

Sawai *et al.* (2012) reportaram aumento da taxa de blastocisto no tratamento com 50nM TSA por 5 h na ativação seguidas de 9 h no cultivo em embriões reconstruídos com fibroblastos da pele, porém não houve aumento na taxa de prenhez e de nascimento em relação ao grupo não tratado. Este tratamento promoveu alterações no *status* epigenético mas não aumentou o desenvolvimento a termo de bovinos clonados. Estas variações nos resultados de diferentes grupos nos sugerem que é difícil regular o *status* epigenético em embriões bovinos clonados por processos artificiais.

Akagi *et al.* (2011) reportaram o aumento na taxa de blastocisto com 5 nM de TSA por 20 h após a ativação em duas linhagens celulares provenientes da orelha de macho (L1) e de fêmea (L2), porém não houve aumento na linhagem celular de pulmão de feto fêmea (L3). Dessa forma, houve o efeito positivo da TSA dependendo da linhagem celular. Essa diferença foi atribuída ao *status* epigenético da célula doadora. As três linhagens celulares apresentaram

diferentes níveis de acetilação da histona H4K12, o que parece influenciar o efeito do tratamento com a TSA. Além disso, o nível de metilação do DNA e o sistema de cultivo *in vitro* podem influenciar os efeitos da TSA.

Sawai *et al.* (2012) combinando os resultados de vários trabalhos concluíram que o tratamento com TSA aumenta a taxa de blastocisto dependendo das condições de tratamento e da célula doadora usada. Todos os trabalhos citados testaram o efeito da TSA em fibroblastos da pele e da orelha, pulmão de feto e células do *cummulus*, diferente desse trabalho que testou o efeito da TSA em embriões reconstruídos com células do cordão umbilical.

Ao contrário dos resultados em suínos (Li *et al.*, 2008) e ratos (Kishigami *et al.*, 2006) em bovinos, apesar de vários trabalhos reportarem o aumento da taxa de blastocisto, não houve efeito pós-implantacional e no desenvolvimento a termo (Sawai *et al.*, 2012; Sangalli *et al.*, 2012).

Vários trabalhos têm demonstrado que a natureza da célula doadora é o fator que mais influencia a eficiência da clonagem e a capacidade de desenvolvimento do clone. Células de diferentes indivíduos apresentam diferentes comportamentos no desenvolvimento *in vitro* de embriões reconstruídos especialmente na taxa de formação de blastocisto. Diferentes indivíduos apresentam diferentes tolerâncias aos processos deletérios como a enucleação, a reconstrução e a eletrofusão. Além de apresentarem diferenças na estrutura do DNA, afetando assim a interação com o ooplasma e o núcleo, além das diferenças no DNA mitocondrial, o que também afeta a reprogramação epigenética (Fu *et al.*, 2008).

A discrepância nos resultados pode ser atribuída ao *status* epigenético da célula doadora usada em cada um dos estudos e aos níveis de metilação do DNA e da acetilação das histonas que variam dependendo do sistema de cultivo *in vitro* usado (Akagi *et al.*, 2013). Além do tipo celular usado, outro fator que deve ser considerado é a variação nos diferentes protocolos de transferência nuclear que são usados principalmente no tipo de ativação química e no tempo de

ativação. Além disso, os diferentes tempos, concentrações e formas de uso (incluindo ou não o uso na ativação) da TSA são variáveis que devem ser consideradas. A incorreta metilação de DNA pode ser deletéria e resultar na morte do embrião no início do desenvolvimento. A literatura relata que existem diferenças entre a metilação global no início do desenvolvimento entre embriões *in vivo* e os provenientes da TN (Ding *et al.*, 2008), mas ainda existem poucos estudos relacionados à identificação desses genes. Alguns trabalhos afirmam que a DNMT1 presente na célula doadora do núcleo pode interferir parcialmente na reprogramação epigenética (Bourc'his *et al.*, 2001). O embrião clone não consegue passar pela desmetilação ativa e passiva assim como os embriões *in vivo* (Dean *et al.*, 2001; Bourc'his *et al.*, 2001). Além disso, existem diferenças individuais na qualidade do oócito, as quais podem resultar numa maior tolerância sobre os efeitos deletérios que ocorrem no processo de transferência nuclear tais como a enucleação e eletrofusão (Yang *et al.*, 2007). Os embriões de clonagem possuem herança mitocondrial da célula doadora e do oócito, o que influencia na modificação do núcleo doador e na competência da reprogramação epigenética (Fu *et al.*, 2008), mas ainda faltam estudos para estabelecer um modelo do processo de reprogramação epigenética para permitir um melhor entendimento das alterações do sistema *in vitro* sobre os processos biológicos.

Uma técnica que tem se destacado para melhorar a eficiência da clonagem é a chamada reclonagem, onde células de um animal clonado são utilizadas como doadoras de núcleo numa segunda rodada de clonagem, esta segunda rodada de reprogramação epigenética possivelmente permitiria reduzir perdas gestacionais e anomalias neonatais por falhas na reprogramação (Driessen, 2008). A reclonagem foi descrita por Robertson (1997) que estabeleceu uma linhagem celular totipotente a partir de um feto de 30 dias, e dessa linhagem utilizou uma única célula na clonagem e alguns dias depois retirou uma célula do agregado de

células do embrião e utilizou numa segunda rodada de clonagem dando origem à vaca clonada chamada 'Gene', nesse estudo foi descrita a eficiência de um nascimento para 18 embriões.

Outros trabalhos têm descrito a remoção cirúrgica de fetos de clonagem de 40 a 55 dias, onde a cabeça e as vísceras são removidas e são realizadas biópsias do tecido fetal para a recloneagem. Hill e colaboradores (2000) não encontraram diferenças na taxa de blastocisto no uso de células de feto clone em relação aos fibroblastos de clone adulto. Contrariamente Driessen (2008) relatou uma maior taxa de blastocisto em embriões reconstruídos com fibroblasto de feto clone (34,4%) em relação aos embriões reconstruídos com fibroblasto de clone adulto (20,2%), além disso os embriões produzidos com fibroblastos fetais sofreram menor estresse oxidativo demonstrando o potencial do uso da recloneagem. Apesar da sua eficiência o procedimento de remoção cirúrgica dos fetos têm sido bastante criticado devido as suas implicações éticas.

Nesse sentido as células do cordão umbilical são uma alternativa para uso na recloneagem, pois estas células fetais podem ser coletadas de modo não-invasivo no momento do nascimento do clone e uma linhagem bem-sucedida na primeira reprogramação epigenética pode ser usada numa segunda rodada de desprogramação. As CCU evitariam, assim, os problemas éticos da remoção cirúrgica de fetos.

Os dados deste estudo configuram o primeiro relato na literatura com o uso das CCU bovinas associadas ao tratamento com TSA. As células do cordão umbilical foram capazes de sofrer reprogramação para suportar o desenvolvimento embrionário, sendo uma alternativa viável para produção de embriões a partir de células fetais menos diferenciadas, pois não passaram pelo processo de gastrulação. Dessa forma, as células do cordão umbilical se mostraram um tipo celular viável para a formação de bancos de germoplasma de células fetais com potencial de uso nas biotecnologias da reprodução animais, tais como a transferência nuclear, recloneagem e a transgenia.

Este experimento e a literatura têm mostrado que as condições ótimas de tratamento com a TSA parecem ser específicas para diferentes tipos celulares e diferentes espécies, sendo necessário investigar o tempo ótimo de exposição e a concentração para que ocorra aumento nas taxas de embriões, e em especial nas taxas pós-implantação de embriões bovinos reconstruídos com células do cordão umbilical por TN.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Em conclusão, este estudo verificou que é possível isolar, cultivar e criopreservar CFA e CCU de forma eficiente para formar um criobanco de células para uso na técnica de TN. De uma maneira geral, as CCU em todas as passagens, e as CFA, até P15, são estáveis em cultivo *in vitro* prolongado e suportam a criopreservação. Estas células mantêm a viabilidade celular, a estabilidade cromossomal e não sofrem fragmentação nuclear. A solução crioprotetora com 10% de DMSO foi a mais indicada para criopreservação de todos os tipos celulares estudados.

As células do cordão umbilical foram mais resistentes, em relação as CFA, e são uma alternativa viável como doadoras de núcleo na transferência nuclear, e são um tipo celular ainda pouco estudado em bovinos. O tratamento das células do cordão umbilical com procaína na concentração de 1,5 mM não viabilizou o seu uso na transferência nuclear, e o tratamento com 50 nM de tricostatina A por 24 h prejudicou a produção embrionária. Porém, o tratamento com tricostatina A por 20 h mostrou ser uma opção viável ao ser usada na ativação e cultivo embrionário. Essas podem servir como método para a obtenção de células fetais em bovinos para finalidades terapêuticas e nas biotecnologias de reprodução assistida, tais como a transferência nuclear, recloneagem e a transgenia.

Nesse sentido, estudos subsequentes ainda são necessários e devem abordar a caracterização molecular das células do cordão umbilical e do fluido amniótico, para que possam ser caracterizadas como células-tronco mesenquimais fetais. Também é necessário avaliar a quantificação do padrão de metilação global de DNA das células e embriões, o que pode ser útil na interpretação do efeito dessas substâncias permitindo assim que o protocolo seja otimizado. Finalmente, os estudos devem testar novas concentrações e tempos de exposição a TSA para as células do cordão umbilical para verificar o real efeito sobre as taxas de blastócitos e incluindo um estudo *in vivo* mais detalhado para obter resultados mais conclusivos sobre os efeitos pós-implantacionais.

9. Referências Bibliográficas

Akagi, S., Matsukawa, K., Mizutani, E., Fukunari, K., Kaneda, M., Watanabe, S., Takahashi, S. Treatment with a histone deacetylase inhibitor after nuclear transfer improves the preimplantation development of cloned bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development*, v.57, p.120–126, 2011.

Akagi, S.; Geshi, M., Nagai, T. Recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer. *Animal Science Journal* , v.84, p. 191–199, 2013.

Baguisi, A., Behboodi, E., Mekan, D.T., Pollock, J.S., Destrempe, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hayes, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overstrom, E.W., Echelard, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology*, v.17, p.456-461, 1999.

Balci, D., Can, A. The Assessment of Cryopreservation Conditions for Human Umbilical Cord Stroma-Derived Mesenchymal Stem Cells towards a Potential Use for Stem Cell Banking. *Current Stem Cell Research & Therapy*. v.8, p.60-72, 2013.

Berg, D.K., Li, C., Asher, G., Wells, D.N., Oback, B. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. *Biology of Reproduction*, v.77, p.384-394, 2007.

Bourc'his, D., Le Bourhis, D., Patin, D., Niveleau, A., Comizzoli, P., Renard, J.P., Viegas-Pequignot, E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Current Biology*, v. 11, p.1542-1546, 2001.

Briggs, R., King, T.J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.38, p.455-461, 1952.

Bromhall, J.D. Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature*, v.258, p.719-162, 1975.

Campbell, K.H.S., Fisher, P., Chen, W.C., Choi, I., Kelly, R.D.W., Lee, J.H., Xhu, J. Somatic Cell Nuclear Transfer: Past, Present And Future Perspectives. *Theriogenology*, v.68, p.214-231, 2007.

Campbell, K.H.S., Mcwhir, J., Ritchie, W.A., Wilmut, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, v.380, p.64-66, 1996.

Cardoso, T.C., Ferrari, H.F., Garcia, A.F., Novais, J.B., Frade, C.S., Ferrarezi, M.C., Andrade, A.L., Gameiro, R. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnology*, v.12, p.1-18, 2012.

Carlin, R., Davis, D., Weiss, M., Schultz, B., Troyer, D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.4, p.8, 2006.

Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponde de leon, A., Robl, J. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. *Science*, v.280, p.1256-1258, 1998.

Cremonesi, F., Corradetti, B., Lange Consiglio, A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: progress and perspectives. *Theriogenology*, v.75 p.1400–1415, 2011.

Daniels, R., Hall, V. and Trounson, A.O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biology of Reproduction*, v.63, p.1034–1040, 2000.

Daniels, R., Hall, V.J., French, A.J., Korfiatis, N.A. and Trounson, A.O. Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques. *Molecular Reproduction and Development*, v.60, p.281–288, 2001.

De Coppi, P., Callegari, A., Chiavegato, A., Gasparotto, L., Piccoli, M., Taiani, J., Pozzobon, M., Boldrin, L., Okabe, M., Cozzi, E., Atala, A., Gamba, P., Sartore, S. Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. *The Journal of Urology*, v.177, p.369–376, 2007.

Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E., Reik, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.98, p.13734-13738, 2001.

Dev, K., Gautam, S.K., Giri, S.K., Kumar, A., Yadav, A., Verma, V., Kumar, P., Singh, B. Isolation, culturing and characterization of feeder-independent amniotic fluid stem cells in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Research in Veterinary Science*, v.93, p. 743-748, 2012a.

Dev, K., Giri, S.K., Kumar, A., Yadav, A., Singh, B., Gautam, K.S.K. Derivation, Characterization and Differentiation of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Amniotic fluid derived stem cells. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, p.704-711, 2012b.

Ding, X.B., Wang, Y.S., Zhang, D., Wang, Y.M., Guo, Z.L., Zhang, Y. Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology*, v.70, p.622–30, 2008.

Driessen, K. Reclonagem usando fibroblasto fetal em bovinos: índices técnicos e análise molecular dos embriões. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília. Brasília. Dissertação de mestrado, 47p., 2008.

Enright, B.P., Kubota, C., Yang, X., Tian, X.C. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-20-deoxycytidine. *Biology of Reproduction*, v.69, p.896 –901, 2003.

Fairburn, H.R., Young, L.E., Hendrich, B.D. Epigenetic Reprogramming: How Now, Cloned Cow? *Current Biology*, v.12, p.68–70, 2002.

Filioli-Uranio, M.F., Valentini, L., Lange-Consiglio, A., Caira, M., Guaricci, A. C., L'abbate, A., Catacchio, C. R., Ventura, M., Cremonesi, F., Dell'aquila, M.E. Isolation, Proliferation, Cytogenetic, and Molecular characterization and In Vitro Differentiation Potency of Canine Stem Cells From Foetal Adnexa: A Comparative Study of Amniotic Fluid, Amnion, and Umbilical Cord Matrix. *Molecular Reproduction and Development*, v.78, p.361–373, 2011.

Forsberg, E.J., Strelchenko, N.S., Augenstein, M.L., Betthausen, J.M., Lange, G.I., Mallon, K.S., Bishop, M.M. Production of cloned cattle from in vitro systems. *Biology of Reproduction*, v.67, p.327-333, 2001.

Fu, J., Guan, P., Zhao, L., Li, H., Huang, S., Zeng, F., Zeng, Y. Effects of donor cells on in vitro development of cloned bovine embryos. *Journal of Genetics & Genomics*, v.35, p.

273–278, 2008.

Giraldo, J.J.G., Oquendo, J.G., Araque, N.V. Efecto de la dimetilformamida sobre la viabilidad posvitricación de embriones bovinos producidos in vitro. *Revista Lasallista de investigación*, v.9, p.13-20, 2012.

Gurdon, J.B., Uehlinger, V. Fertile intestine nuclei. *Nature*, v.210, p.1240-1241, 1966

Hayes, O., Rodríguez, L.L., González, A., Falcón, V., Aguilar, A., Castro, F.O. Effect of cryopreservation on fusion efficiency and in vitro development into blastocysts of bovine cell lines used in somatic cell cloning. *Zygote*, v.4, p.277-82, 2005.

Hill, J.R., Winger, Q.A., Long, C.R., Looney, C.R., Thompson, J.A., Westhusin, M.E., Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biology of Reproduction*, v.62, p.1135-1140, 2000.

Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krauser, D.S., Keating, A. The International Society for Cellular Therapy: Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v.7, p.393-395, 2005.

Hoynowski, S.M., Fry, M.M., Gardner, B.M., Leming, M.T., Tucker, J.R., Black, L., Theodore, S., Mitchell, K.E. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.362, p. 347–353, 2007.

Hughes, E.A., Davies, D.A. Practical uses of ultrasound in early pregnancy in cattle. *The veterinary record*, v.124, p. 456-458, 1989.

Iacono, E., Brunori, L. Pirrone, A., Pagliaro, P.P., Ricci, F., Tazzari, P.L., Merlo, B. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Reproduction*, v. 143, p. 455–468, 2012.

Janz, F.L., Debes, A.A., Cavaglieri, R.C., Duarte, S.A., Romão, C.M., Morón, M.Z., Bydłowski, S.P. Evaluation of Distinct Freezing Methods and Cryoprotectants for Human Amniotic Fluid Stem Cells Cryopreservation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012 p. 1-10, 2012.

Jeon, B.G., Coppola, G., Perrault, S.D., Rho, G.J., Betts, D.H., King, W.A. sadenosylhomocysteine treatment of adult female fibroblasts alters x-chromosome inactivation and improves in vitro embryo development after somatic cell nuclear transfer. *Reproduction*, v. 135, p. 815–828, 2008.

Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H., Tsunoda, Y. 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.

Kim, J., Lee, Y., Kim, H., Hwang, K.J., Kwon, H.C., Kim, S.K., Cho, D.J., Kang, S. G., You, J. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Proliferation*, v.40, p.75–90, 2007.

Kishigami, S., Bui, H.T., Wakayama, S., Tokunaga, K., Van Thuan, N., Hikichi, T.

Successful mouse cloning of an outbred strain by trichostatin A treatment after somatic nuclear transfer. *Journal of Reproduction and Development*, v.53, p.165–70, 2007.

Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Thuan, N.V., Wakayama, S., Bui, H., Wakayama, T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.340, p. 183–189, 2006.

Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Mizoshita, K., Tabara, N., Barber, M., Yang, X. Six Cloned Calves Produced From Adult Fibroblast Cells After Long-Term Culture. *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America*, v.97, p.990-995, 2000.

Lacerda, V.A.M. Impactos do uso da procaína como agente desmetilante de DNA no sistema de cultivo celular de bovinos. Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília. Brasília, Dissertação de mestrado, 105 p., 2010.

Lanza, R.P., Cibelli, J.B., Moraes, C.T., Farin, P.W., Farin, C.E., Hammer, M., West, M.D., Damiani, P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*, v.2, p.79-90, 2000.

Lee, M., Kim, S., Lee, H., Im, G., Yang, B., Kim, N., Kim, D. Trichostatin A promotes the development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Journal of Reproduction and Development*, v.57, p. 34-42, 2011.

Li, J., Svarcova, O., Villemoes, K., Kragh, P.M., Schmidt, M., Bogh, I.B., Zhang, Y., Du, Y., Lin, L., Purup, S., Xue, Q., Bolund, L., Yang, H., Maddox-Hyttel, P., Vajta, G. High in vitro development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology* v.70, p.800–808, 2008.

Mann, M.R.W. and Bartolomei, M.S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biology*, v. 3, p. 1003.1–1003.4, 2002.

Martins, C.F., Bão, S.N., Dode, M.N., Correa, G.A., Rumpf, R. Effects Of Freeze-Drying On Cytology, Ultrastructure, Dna Fragmentation, And Fertilizing Ability Of Bovine Sperm. *Theriogenology*, v.67, p.1307-1315, 2007.

Mastromonaco, G.F., Perrault, S.D., Betts, D.H., King, W.A. Role Of Chromosome Stability And Telomere Length In The Production Of Viable Cells Lines For Somatic Cell Nuclear Transfer. *Bmc Developmental Biology*, v.6, p.1-13, 2006.

Mauro, A., Turriani, M., Ioannoni, A., Russo, V., Martelli, A., Giacinto, O.D., Nardinicchi, D., Berardinelli, P. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. *Veterinary Research Communications*, v.34 p. S25–S28, 2010.

Mello, M.R.B., Caetano, H.V.A., Marques, M.G., Padilha, M.S., Garcia, J.F., Milazzotto, M.P., Assumpção, M.E.O.A., Lima, A.S., Nicácio, A.C., Mendes, C.M., Oliveira, V.P., Visintin, J.A. Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, v. 36, p.1485-1489, 2003 .

Merighe, G.K.F., Miranda, M.S., Bem, T.H.C., Watanabe, Y.F., Meirelles, F.V. Efeito do número da passagem e do gênero das células doadoras de núcleo no desenvolvimento de bovinos produzidos por transferência nuclear. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.39, p.2166-2173, 2010.

Miki, T., Strom, S. Amnion Derived Pluripotent/Multipotent Stem Cell. *Stem Cell Reviews*, v.2, p.133-141, 2006.

Miranda-Sayago, J.M., Fernandes-Arcas, N., Benito, C., Reyes-engel, A., Herrero, J.R., Alonso, A. Evaluation of a low cost cryopreservation system on the biology of human amniotic fluid derived mesenchymal stromal cells. *Cryobiology*, v. 64, p. 160-166, 2012.

Nel-Themaat, L., Gómez, M.C., Damiani, P., Wirtu, G., Dresser, B.L., Bondioli, K.R., Lyons, L.A., Pope, E.C.E., Godke, R.A. Isolation, Culture And Characterisation Of Somatic Cells Derived From Semen And Milk Of Endangered Sheep And Eland Antelope. *Reproduction, Fertility and Development*, v.19, p.576–584, 2007.

Park, S.B., Seo, M.S., Kang, J.G., Chae, J.S., Kang, K.S. Isolation and characterization of equine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. *Cytotherapy*, v. 13, p.341–349, 2011.

Prather, R.S., Barnes, F.L., Sims, M.M., Robl, J.M., Eystone, W.H., Fist, N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biology of Reproduction*, v.37, p.859-866, 1987.

Raoufi, M.F., Dehghan, M.M., Eini, F., Barin, A. Isolation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Bovine Umbilical Cord Blood. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, p.95–99, 2011.

Robertson, D., "Gene," another landmark in farmyard cloning. *Nature Biotechnology* v.15, p.833, 1997.

Rumpf, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, p.229-233, 2007.

Ryder, O.A. Cloning Advances and Challenges For Conservation. *Trends Biotechnology*, v.20, p.231–232, 2002.

Sangalli, J.R., De Bem, T.H., Perecin, F., Chiaratti, M.R., Oliveira, L.D., de Araújo, R.R., Valim Pimentel, J.R., Smith, L.C., Meirelles, F.V. Treatment of nuclear-donor cells or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term development of cloned cattle. *Cellular Reprogramming*, v.14, p. 235– 247, 2012.

Sansinena, M.J., Taylor, S.A., Taylor, P.J., Denniston, R.S., Godke, R.A. Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) embryos from *in vitro* matured llama oocytes. *Cloning Stem Cells*, v.5, p.191-198, 2003.

Sawai, K., Fujii, T., Hirayama, H., Hashizume, T., Minamihashi, A. Epigenetic status and full-term development of bovine cloned embryos treated with trichostatin A. *Journal of Reproduction and Development*, v.58, p.302–309, 2012.

Shin, D., Lu, F., Wei, Y., Cui, K., Yang, S., Wei, J., Msevov, T.G. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biology of Reproduction*, v.77, p.285-291, 2007.

Spermann, H. Embryonic development and induction. New York: Hafner, p.210-211, 1938.

Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M., Parnpai, R. Full term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin a treatment. *Cellular Reprogramming*, v.14, p.248–257, 2012.

Surani, M.A. Reprograming of genome function throught epigenetic inheritance. *Nature*, v.414, p. 112-128, 2001.

Suttevun, T., Parnpai, R., Smith, S.L., Chang, C., Muenthaisong, S., Tian, X.C. Epigenetic Characteristics Of Cloned And *In Vitro*-Fertilized Swamp Buffalo (*Bubalus Bubalis*) Embryos. *Journal of Animal Science*, v.84, p.2065-2071, 2006.

Tada, M., Imazeki, F., Fukai, K., Sakamoto, A., Arai, M., Mikata, R., Tokuhisa, T., Yokosuka, O. Procaine inhibits the proliferation and DNA methylation in human hepatoma cells. *Hepatology International*, v. 1, p. 355-364, 2007.

Tsuji, Y., Kato, Y., Tsunoda, Y. The developmental potential of mouse somatic cell nuclear-transferred oocytes treated with trichostatin A and 5-aza-2-deoxycytidine. *Zygote*, v. 17, p. 109–115, 2009.

Villamil, P.R. Vitirficação de blastocistos *Mus domesticus domesticus* expostos à solução crioprotetora com dimetilformamida e envase em microcapilares produzidos industrialmente. Dissertação de mestrado (69 p.). Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

Villar-Garea, A., Fraga, M.F., Espada, J., Esteller, M. Procaine is a DNA demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Research*, v. 63, p. 4984–4989, 2003.

Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., Yanagimachi, R. Full-Term Development Of Mice From Enucleated Oocytes Injected With Cumulus Cell Nuclei. *Nature*, v. 394, p. 369–374, 1998.

Wang, Y., Su, J., Wang, L., Xu, W., Quan, F., Liu, J., Zhang, Y. The effects of 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on gene expression and DNA methylation status in cloned bovine blastocysts. *Cell Reprograming*, v.13(4), p. 297-306, 2011a.

Wang, Y.S., Xiong, X.R., An, Z.X., Wang, L.J., Liu, J., Quan, F.S., Hua, S., Zhang, Y. Production of cloned calves by combination treatment of both donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology*, v. 15, p.819-25, 2011b.

Ward WS. The structure of the sleeping genome: implication of sperm DNA organization for somatic cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.55, p.77–82, 1994.

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

Wilmut, I., Schnieke, A.E., Mcwhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H. Viable Offspring Derived From Fetal and Adult Mammalian Cells. *Nature*, v.385, p.810–813, 1997.

Yang, X., Smith, L.S., Tian, X.C., Lewin, H.A., Renard, J.P., Wakayama, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nature Genetics Review*, v.29, p.295-302, 2007.

Zheng, Y., Zhao, H., Zhao, X., Quan, F., Hua, S., He, X., Liu, J., He, X., Lin, H. Development of cloned embryos from porcine neural stem cells and amniotic fluid-derived

stem cells transfected with enhanced green fluorescence protein gene. *Reproduction*, v.137, p.793–801, 2009.

Zucconi, E., Vieira, N.M., Bueno, D.F., Secco, M., Jazedje, T., Ambrosio, C.E., Passos-Bueno, M.R., Miglino, M.A., Zatz, M. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein—A novel source for cell therapy studies. *Stem Cells and Development*, v. 19, p.395–402, 2010.