



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

**CARACTERIZAÇÃO EPIGENÉTICA DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS BOVINAS DERIVADAS DO FLUIDO AMNIÓTICO E DO
TECIDO ADIPOSEO E SUA UTILIZAÇÃO COMO DOADORAS DE NÚCLEO
NA CLONAGEM NA PRESENÇA OU NÃO DE TRICOSTATINA A**

CAROLINA GONZALES DA SILVA

BRASÍLIA-DF

2017



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

**CARACTERIZAÇÃO EPIGENÉTICA DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS BOVINAS DERIVADAS DO FLUIDO AMNIÓTICO E DO
TECIDO ADIPOSEO E SUA UTILIZAÇÃO COMO DOADORAS DE NÚCLEO
NA CLONAGEM NA PRESENÇA OU NÃO DE TRICOSTATINA A**

Carolina Gonzales da Silva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sônia Nair Bão

Co-orientador: Dr. Carlos Frederico Martins

BRASÍLIA-DF, 2017

“A razão cardeal de toda superioridade humana é, sem dúvida, a vontade. O poder nasce do querer. Sempre que um homem aplica a veemência e a perseverante energia de sua alma a um fim, ele vencerá os obstáculos, e se não atingir o alvo, fará pelo menos coisas admiráveis.”

José de Alencar

Agradecimentos

O meu agradecimento sempre em primeiro lugar a Deus, por me dar saúde e muita força para sempre correr atrás dos meus sonhos e objetivos, por ser a luz quando tudo parece ser somente escuridão e por ser o porto seguro de onde tiro forças e coragem para seguir em frente.

Agradeço aos meus pais, Entrigenia Gonzales e José da Silva, pelo apoio incondicional e por acreditarem no meu potencial e em mim depositarem confiança. Por suportarem a minha ausência por acreditar em um objetivo maior a ser alcançado

À minha orientadora Sônia Nair Bão por tantos anos de trabalho juntas, pela disciplina e excelência cobrados, pela compreensão, confiança e credibilidade e por acreditar no meu trabalho e no meu potencial.

Ao meu co-orientador Carlos Frederico Martins por me ensinar grande parte do meu conhecimento sobre Biotecnologia da Reprodução, por sempre acreditar na minha capacidade e confiar no meu trabalho.

Aos professores e pesquisadores Maurício Franco Machaim e Teresa Cristina Cardoso por contribuírem grandemente com este trabalho por meio de análises, discussões e ajuda de todo o tipo.

À Embrapa Cerrados, em especial à fazenda experimental CTZL onde passei os meus últimos sete anos de vida quase que diariamente, local de trabalho que também já foi minha casa. Por fornecer todo suporte técnico necessário para a realização desse experimento.

Aos funcionários da fazenda CTZL, sem os quais jamais esse trabalho estaria concluído, desde os funcionários da limpeza, passando pelos técnicos de campo e de laboratório, em especial à Heidi Christina Bessler, funcionários do administrativo e

pesquisadores, todos tiveram sua parcela de contribuição para a realização deste experimento.

À Embrapa Cenargen, UNESP Jaboticabal e Universidade de Brasília que também forneceram suporte técnico para realização de parte desse experimento. À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro na execução do projeto e pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos abatedouros-frigoríficos Bomboi e Acaluz e aos seus funcionários, que nunca mediram esforços nem se opuseram a me auxiliar nas coletas de ovários, que são um material biológico extremamente importante na realização desse experimento.

Aos meus alunos de graduação que me fizeram aprimorar a arte de ensinar e aprender que ser professor não é só transmitir conhecimento, mas ser exemplo e trazer para si diferentes realidades e histórias de vida, se sensibilizar com elas e fazer a diferença em cada uma dessas histórias.

A todos os meus amigos que não conseguirei citar aqui, mas em especial a duas pessoas que fazem a diferença na minha vida, que me completam e me entendem, me ajudam e me seguram: Viviane Yllena e Ana Carolina Cintra Faria. Não consigo escrever para vocês sem me virem lágrimas aos olhos, só posso dizer que as amo e muito obrigada!

RESUMO

O sucesso da clonagem por transferência nuclear (TN) está diretamente relacionado ao *status* epigenético da célula doadora de núcleo. Quanto menos diferenciada a célula, mais fácil é a reprogramação nuclear a um estado embrionário. Da mesma forma, o uso de drogas que atuem nos mecanismos de regulação epigenética, tal como a Tricostatina A (TSA), ajudam nessa reprogramação. O objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização epigenética de três tipos de células doadoras de núcleo, sendo elas células-tronco mesenquimais (CTM) provenientes de duas fontes: fluido amniótico (CTM-FA) e tecido adiposo (CTM-TA), e fibroblastos (FIB) da orelha de bovinos; testar o efeito de sua utilização na TN com e sem a adição de TSA; verificar a expressão de genes ligados à epigenética: KAT2A, HDAC1 e HDAC3. Para isso, foram coletas CTM-FA por amniocentese *in vivo* de dois bovinos (BOV 1 e BOV 2) da raça Gir durante a gestação. Após o nascimento, foram realizadas biópsias de tecido adiposo e pele para isolamento de CTM-TA e FIB, respectivamente. As células foram cultivadas em incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂ e umidade elevada. Após isolamento, as células foram utilizadas para caracterização de sua origem mesenquimal por meio de marcadores de superfície celular verificados por citometria de fluxo e capacidade de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos. O DNA genômico de todos os tipos celulares foi extraído pelo método de *salting out* e os *status* de metilação e hidroximetilação global do DNA foram determinados utilizando os kits MethylFlashTM Methylated DNA Quantification (Colorimetric) e MethylFlashTM Hydroxymethylated DNA Quantification (Colorimetric) (Epigentek), respectivamente. Para a clonagem, ovários foram coletados de abatedouros-frigoríficos para isolamento de ovócitos, que foram submetidos a 18 horas de maturação *in vitro*. Após a maturação os ovócitos foram enucleados e a célula doadora foi inserida no espaço perivitelínico. Para incorporação da célula ao citoplasma ovocitário, foi realizada a eletrofusão e então, os citoplastos foram submetidos ao cultivo com 50 nM de TSA por 20 h ou em meio sem a TSA. Após sete e oito dias de cultivo a taxa de produção de embriões foi calculada e comparada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As culturas celulares das células provenientes do tecido adiposo e do fluido amniótico exibiram os marcadores típicos de CTM na maior porcentagem das células. Observaram-se resultados opostos entre os animais para a metilação do DNA, pois no animal BOV1, as CTM mostraram-se mais metiladas que os FIB, ao contrário do animal BOV2 onde FIB foram mais metilados que as células-tronco. Já o resultado de hidroximetilação seguiu o mesmo padrão para todas as células nos animais BOV1 e BOV2, respectivamente, sendo que CTM-FA foram as menos hidroximetiladas (0,008 e 0,002%), seguidas de FIB (0,013 e 0,009%) e CTM-TA (0,072 e 0,03%). Ao analisar as taxas de produção de embriões com sete dias de desenvolvimento, para o animal BOV1 nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os tratamentos. Já para o animal BOV2, as CTM-FA produziram $44,92 \pm 8,88\%$ de blastocistos clonados quando os embriões foram expostos a 20 h com a TSA. Esse resultado foi superior a todos os outros tratamentos sem a TSA e semelhante ao tratamento com CTM-TA também com uso da TSA ($37,96 \pm 15,80\%$). Os embriões produzidos a partir das CTM-FA do BOV2 expressaram menos HDAC3 quando foram tratados com TSA, além disso, quando não foi utilizada TSA no cultivo, os embriões reconstruídos com FIB apresentaram menor expressão, semelhante aos embriões reconstruídos com CTM-TA. Por fim, a expressão de KTA2A foi maior em embriões tratados com TSA por 20 h quando foram utilizadas CTM, independente da fonte, como doadoras de núcleo. Estes resultados demonstram que quando as CTM foram menos metiladas que FIB, sua associação com TSA foi efetiva em aumentar a produção dos

embriões bovinos clonados, entretanto, em contraste, quando as CTM foram mais metiladas sua associação com TSA gerou embriões numa proporção estatisticamente semelhante àquela obtida com CTM na ausência de TSA. Ademais, o uso da TSA foi efetivo em reduzir a expressão da HDAC3 quando CTM-FA foram utilizadas.

Palavras chave: hidroximetilação; histona desacetilase; inibidor de HDAC; metilação; transferência nuclear.

ABSTRACT

The success of cloning by Nuclear Transfer (NT) is directly related to the epigenetic *status* of the nucleus donor cell. The less differentiated is the cell, the easier is nuclear reprogramming to an embryonic state. Likewise, the use of drugs acting on mechanisms of epigenetic regulation, such as Trichostatin A (TSA), would aid in reprogramming. The objective of this work was to perform the epigenetic characterization of three types of donor nucleus cells, being mesenchymal stem cells (MSC) from two sources: amniotic fluid (MSC-AF) and adipose tissue (MSC-AT), and fibroblasts (FIB) of bovine ear; test the effect of its use on NT with and without the addition of TSA; to verify the expression of genes linked to epigenetics: KAT2A, HDAC1 and HDAC3. For this, MSC-AF samples were collected by amniocentesis *in vivo* of two Gyr cows (BOV 1 and BOV 2) during gestation. After birth, adipose tissue and skin biopsies were collected for isolation of MSC-AT and FIB, respectively. Cells were grown in incubator at 38.5°C, 5% CO₂ and elevated humidity. After isolation, the cells were used to characterize their mesenchymal origin by means of cell surface markers verified by flow cytometry and differentiation capacity in adipocytes, chondrocytes and osteocytes. The genomic DNA of all cell types was extracted by the salting out method and the methylation and hydroxymethylation *status* of the DNA were determined using the MethylFlash™ Methylated DNA Quantification (Colorimetric) and MethylFlash™ Hydroxymethylated DNA Quantification (Colorimetric) (Epigentek) kits, respectively. For cloning, ovaries were collected from slaughterhouses to isolate oocytes, which were submitted to 18 hours of *in vitro* maturation. After maturation, the oocytes were enucleated and the donor cell was inserted into the perivitelline space. For incorporation of the cell into the oocyte cytoplasm, electrofusion was performed and then the cytoplasts were cultured with 50 nM TSA for 20 h or in medium without TSA. After seven and eight days of culture the rate of embryo production was calculated and compared by Tukey's test ($p < 0.05$). Cellular cultures of cells from adipose tissue and amniotic fluid exhibited typical MSC markers in the highest percentage of cells. Opposite results were observed among the animals for DNA methylation, because in the BOV1, the MSC were more methylated than the FIB, unlike the BOV2 where FIB were more methylated than the MSC. The hydroxymethylation result followed the same pattern for all cells: MSC-AF were the least hydroxymethylated (0.008 and 0.002%), followed by FIB (0.013 and 0.009%) and MSC-AT (0.072 and 0.03%), respectively for BOV1 and BOV2. When analyzing the production rates of embryos with seven days of development, for the BOV1 no significant difference was found between the treatments. For the BOV2, the MSC-AF produced $44.92 \pm 8.88\%$ of cloned blastocysts when the embryos were exposed at 20 h with TSA. This result was superior to all other treatments without TSA and similar to treatment with MSC-AT also using TSA ($37.96 \pm 15.80\%$). Embryos produced from the BOV2 with MSC-AF expressed less HDAC3 when treated with TSA; in addition, when TSA was not used in the culture, the embryos reconstructed with FIB presented lower expression, similar to embryos reconstructed with MSC-AT. Finally, KTA2A expression was higher in TSA treated embryos for 20 h when MSC, regardless of source, were used as donor nuclei. These results demonstrate that when MSC was less methylated than FIB, its association with TSA was effective in increasing the production of cloned bovine embryos, however, in contrast, when MSC was more methylated its association with TSA generated embryos in a ratio statistically similar to that obtained with MSC in the absence of TSA. In addition, the use of TSA was effective in reducing the expression of HDAC3 when MSC-AF were used.

Keywords: HDAC inhibitor; histone deacetylase; hydroxymethylation; methylation; nuclear transfer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo proposto para alterações na manutenção da metilação devido a alterações no DNA. B) A oxidação da 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina previne a metilação DNMT1 da citosina na fita oposta. A perda da atividade de metilação da DNMT1 na fita filha no sítio CpG oxidado resulta em perda de metilação no sítio CpG na célula filha. Fonte: Valinluck e Sowers, 2007 6
- Figura 2.** Organização da cromatina e cauda da histona H3. Assim como as caudas das outras histonas, o N-terminal da H3 (vermelho) representa um domínio altamente conservado que está susceptível a ser exposto ou prolongado para fora da fibra da cromatina. Várias modificações pós-traducionais distintas são conhecidas por ocorrer no N-terminal da H3, incluindo acetilação (bandeira verde), fosforilação (círculo branco) e metilação (hexágono amarelo). Outras modificações são conhecidas e podem ocorrer no domínio globular. Adaptado de Strahl e Allis, 2000. Fonte: Silva et al., 2016..... 8
- Figura 3.** Regulação da atividade transcricional pela modificação das histonas. As modificações pós-traducionais nas proteínas histonas são necessárias para regular a ativação ou a repressão à atividade transcricional. a) As modificações nas histonas descompactam a cromatina e permitem o acesso a maquinaria transcricional do DNA. Entre essas modificações está a acetilação das lisinas nas histonas H3 e H4 pelas histonas acetil transferases (HAT); b) Compactação das histonas, evitando o acesso da maquinaria transcricional ao DNA. Entre os mecanismos mais importantes se encontram a desacetilação das lisinas nas histonas H3 e H4 pelas histonas desacetilases (HDAC). O início desse processo implica o recrutamento simultâneo das histonas metiltransferases (HMT), das DNA metiltransferases (DNMT) e das proteínas de união

a citocinas metiladas (MBD), levando ao silenciamento gênico. Fonte: Uribe Yunda e Mancera, 2014..... 9

Figura 4. Reprogramação do padrão de metilação do DNA em embriões bovinos normais e clonados, de acordo com Bourc'his et al., 2001. Os níveis de metilação da heterocromatina (cores mais escuras) e eucromatina (cores mais claras) nos embriões bovinos normais diminuem através do desenvolvimento pré-implantacional, deixando o blastocisto hipometilado, apesar da heterocromatina do centrômero permanecer parcialmente metilada. Os cromossomos dos embriões clonados (em verde) mostram uma desmetilação passiva ocorrendo antes do estágio de 8-16 células. As sequências de heterocromatina nos blastocistos clonados retêm mais altos níveis de metilação do que de embriões normais. Fonte: adaptada de Fairburn et al., 2002 12

Figura 5. A) Sistema utilizado para aspiração *in vivo* de líquido amniótico; B) Imagem ultrassonográfica demonstrando o correto posicionamento do feto no momento da coleta do líquido amniótico, as três linhas tracejadas apontam a orientação da saída da agulha..... 24

Figura 6. Coleta das biópsias em região perineal de bovino para isolamento das células do tecido adiposo..... 26

Figura 7. Bovinos fêmeas da raça Gir com um ano de idade em que se procedeu a coleta das células do fluido amniótico, células do tecido adiposo e fibroblastos. A) Animal BOV1; B) Animal BOV2.....27

Figura 8. Coleta e cultivo de biópsia de pele para isolamento de fibroblastos bovinos. A) Biópsia de pele e cartilagem de orelha; B) Fragmento de pele separado da cartilagem; C) Fragmentos de biópsia de pele da orelha acrescidos de meio de cultivo celular 28

- Figura 9.** Esquema do procedimento de Transferência Nuclear e exposição dos embriões à tricostatina A (TSA) nos meios de ativação com 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) por 4 horas e adicionalmente por 16 horas no cultivo *in vitro* (CIV)..... 36
- Figura 10.** Sequência de eventos utilizados para produção de um clone bovino por Transferência de Núcleos..... 39
- Figura 11.** Porcentagem de cada marcador de superfície obtido por transformação dos resultados da citometria de fluxo e imunocoloração em média geométrica do logaritmo de cinco repetições com intervalo de confiança de 95%. *Médias estatisticamente diferentes ($p < 0,005$). Resultados para células do fluido amniótico de BOV1 (A) e BOV2 (B); resultados para células do tecido adiposo de BOV1 (C) e BOV2 (D). Controle realizado com células MDBK..... 45
- Figura 12.** Análise de transcriptoma de marcadores de pluripotência de células-tronco mesenquimais derivadas do fluido amniótico (CTM-FA) e tecido adiposo (CTM-TA). A expressão gênica relativa está representada como média + desvio padrão obtida de quatro experimentos diferentes. A linha pontilhada está posicionada na média dos marcadores conhecidos negativos de célula-tronco mesenquimal. Genes com valores de expressão relativa acima dessa linha foram considerados upregulated e foram analisados em comparação ao controle compreendendo a população de linfócitos T bovinos.....46
- Figura 13.** Diferenciação da células-tronco mesenquimais em linhagens celulares. Para cada protocolo de diferenciação, células indiferenciadas foram mantidas para o controle (A). B) Diferenciação em condrócitos confirmada pela coloração de Safranina O, revelando glicosaminoglicanos; C) Diferenciação em adipócitos confirmada pela coloração de *Oil Red*, destacando os depósitos lipídicos em vermelho; D) Diferenciação

em osteócitos com depósitos de cálcio confirmada pela coloração de *Alizarin Red*..... 47

Figura 14. Gel de eletroforese (0,8% de agarose) resultante da extração do DNA das células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA), células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) e fibroblastos (FIB). M: marcador molecular de 1 kb. *Animal BOV1; **Animal BOV2. ¹Quantidade de DNA mensurada por observação do gel; ²Quantidade de DNA mensurada pelo NanoDrop®. P6: células utilizadas na sexta passagem; P7: células utilizadas na sétima passagem..... 48

Figura 15. Porcentagem de metilação global do DNA das células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA), células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) e fibroblastos (FIB) para o animal BOV1. ^{a,b}Letras diferentes nas barras representam diferença estatística ($p < 0,05$)..... 49

Figura 16. Porcentagem de metilação global do DNA das células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA), células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) e fibroblastos (FIB) para o animal BOV2. ^{a,b}Letras diferentes nas barras representam diferença estatística ($p < 0,05$)..... 50

Figura 17. Porcentagem de hidroximetilação global do DNA das células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA), células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) e fibroblastos (FIB) para o animal BOV1.....50

Figura 18. Porcentagem de hidroximetilação global do DNA das células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA), células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) e fibroblastos (FIB) para o animal BOV2.....51

Figura 19. Embriões com sete dias de desenvolvimento, clonados a partir de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA), células-tronco mesenquimais do

fluido amniótico (CTM-FA) e fibroblastos da pele (FIB) sem uso de Tricostatina A no meio de cultivo (A, C e E), e com Tricostatina A por 20 horas no cultivo (B, D e F)..... 56

Figura 20. A) Bovinos da raça Gir utilizados e produzidos durante o experimento: fêmea bovina doadora de células (seta branca) e clone produzido a partir dessas células (seta preta). B) Animal doador de material genético para a clonagem por Transferência Nuclear, BOV1 (Calidora), aos três anos de idade; C) Animal (Acácia) proveniente de clonagem com fibroblastos da orelha do BOV1 aos quatro meses de idade..... 58

Figura 21. Abundância relativa de RNAm do gene HDAC3 em blastocistos bovinos clonados a partir de células-tronco do fluido amniótico tratados por 20 h no meio de cultivo com tricostatina A (CTM-FA-20h) ou não tratados (CTM-FA-ST). Letras diferentes nas colunas representam diferença significativa ($P=0,0624$).....59

Figura 22. Abundância relativa de RNAm do gene HDAC3 em blastocistos bovinos clonados a partir de fibroblastos da orelha (FIB-ST), células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA-ST) e células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA-ST) não tratados com tricostatina A. Letras diferentes nas colunas representam diferença significativa ($P=0,0625$).....60

Figura 23. Abundância relativa de RNAm do gene KAT2A em blastocistos bovinos clonados tratados com tricostatina A por 20 h no meio de cultivo utilizando fibroblastos da orelha (FIB-20h), células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA-20h) e células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA-20h). Letras diferentes nas colunas representam diferença significativa ($P=0,0484$).....61

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Especificações dos anticorpos primários utilizados na citometria de fluxo para caracterizar as células-tronco mesenquimais..... | 30 |
| Tabela 2. Especificações do nome de genes bovinos (<i>Bos taurus</i>) marcadores positivos de pluripotencialidade de células-tronco, sua descrição e localização pesquisados por microarranjo e qRT-PCR..... | 33 |
| Tabela 3. Informação dos <i>primers</i> específicos usados para amplificação dos fragmentos de genes para análise em qPCR tempo real..... | 42 |
| Tabela 4. Quantidade de estruturas manipuladas para produção de embriões bovinos clonados a partir de células-tronco mesenquimais provenientes do fluido amniótico (CTM-FA) e do tecido adiposo (CTM-TA), e fibroblastos da orelha (FIB) do bovino da linhagem 1 (BOV1) na presença de tricostatina A por 20 horas (h) em cultivo ou sem a tricostatina A (ST)..... | 52 |
| Tabela 5. Quantidade de estruturas manipuladas para produção de embriões bovinos clonados a partir de células-tronco mesenquimais provenientes do fluido amniótico (CTM-FA) e do tecido adiposo (CTM-TA), e fibroblastos da orelha (FIB) do bovino da linhagem 2 (BOV2) na presença de tricostatina A por 20 horas (h) em cultivo ou sem a tricostatina A (ST)..... | 53 |
| Tabela 6. Taxas de fusão, clivagem e blastocistos bovinos obtidos por transferência nuclear utilizando células-tronco mesenquimais provenientes do fluido amniótico (CTM-FA) e do tecido adiposo (CTM-TA), e fibroblastos da orelha (FIB) do bovino da linhagem 1 (BOV1) na presença de tricostatina A (TSA) por 20 horas (h) em cultivo ou sem a TSA (ST)..... | 55 |

Tabela 7. Taxas de fusão, clivagem e blastocistos bovinos obtidos por transferência nuclear utilizando células-tronco mesenquimais provenientes do fluido amniótico (CTM-FA) e do tecido adiposo (CTM-TA), e fibroblastos da orelha (FIB) do bovino da linhagem 2 (BOV2) na presença de tricostatina A (TSA) por 20 horas (h) em cultivo ou sem a TSA (ST)..... 55

Tabela 8. Prenhezes resultantes da transferência de embriões bovinos clonados a partir de células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA) e do tecido adiposo (CTM-TA), e fibroblastos da orelha (FIB) do bovino da linhagem 1 (BOV1) na presença de tricostatina A (TSA) por 20 horas (h) em cultivo ou sem a TSA (ST)..... 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCO – complexos *cumulus*-ovócitos

CTM – células-tronco mesenquimais

CTM-FA – células-tronco mesenquimais do fluido amniótico

CTM-TA – células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

CTZL - Centro de Tecnologias de Raças Zebuínas Leiteiras

DMEM – *Dubelcco's Modified Eagle Medium*

DMSO – dimetilsulfóxido

DNMT – DNA metiltransferase

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylenediamine tetraacetic acid*)

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FIB – fibroblastos

HAT – histona acetilase

HDACi – inibidor de histona desacetilase

LAV – meio de lavagem

LOS - *large offspring syndrome*

MIV – meio de maturação

MSC – *mesenchymal stem cell*

PBS - *phosphate-buffered saline*

SFB – soro fetal bovino

TNCS – Transferência Nuclear de Células Somáticas

TSA – tricostatina A

UV - ultravioleta

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS)..... | 3 |
| 2.2 Epigenética..... | 4 |
| 2.2.1 Mecanismos de controle epigenético – Metilação do DNA..... | 5 |
| 2.2.2 Mecanismos de controle epigenético – Hidroximetilação do DNA..... | 5 |
| 2.2.3 Mecanismos de controle epigenético – Acetilação das histonas..... | 7 |
| 2.3 Reprogramação epigenética na TNCS..... | 10 |
| 2.4 Drogas modificadoras da cromatina..... | 14 |
| 2.5 Células-tronco mesenquimais..... | 17 |
| 2.6 Associação de célula doadora e droga inibidora de HDAC..... | 19 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 21 |
| 4. HIPÓTESE..... | 22 |
| 5. OBJETIVOS..... | 23 |
| 5.1. Objetivos gerais..... | 23 |
| 5.2. Objetivos específicos..... | 23 |
| 6. MATERIAL E MÉTODOS..... | 24 |
| 6.1 Ética na experimentação..... | 24 |
| 6.2 Local..... | 24 |
| 6.3 Isolamento <i>in vivo</i> e cultivo <i>in vitro</i> dos diferentes tipos celulares..... | 24 |
| 6.3.1 Isolamento das células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA)..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 6.3.2 Isolamento das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA)..... | 26 |
| 6.3.3 Isolamento dos fibroblastos de pele da orelha (FIB)..... | 28 |
| 6.4 Criopreservação das células..... | 29 |
| 6.5 Caracterização das células tronco mesenquimais..... | 30 |
| 6.6 Padrão de metilação e hidroximetilação global das células..... | 33 |
| 6.6.1 Extração de DNA genômico..... | 33 |
| 6.6.2 Metilação e hidroximetilação global..... | 34 |
| 6.7 Preparação da TSA..... | 35 |
| 6.8 Transferência nuclear de célula somática..... | 35 |
| 6.8.1 Maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos..... | 35 |
| 6.8.2 Tratamentos experimentais..... | 36 |
| 6.8.3 Transferência nuclear com os três tipos celulares..... | 37 |
| 6.9 Inovulação dos embriões e monitoramento da gestação..... | 40 |
| 6.10 Congelamento de embriões destinados à expressão gênica..... | 40 |
| 6.11 Análise de expressão KAT2A, HDAC1 e HDAC2..... | 41 |
| 6.12 Análise estatística..... | 42 |
| 7. RESULTADOS..... | 44 |
| 7.1 Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais (CTM)..... | 44 |
| 7.2 Extração de DNA genômico..... | 47 |
| 7.3 Metilação e hidroximetilação global dos tipos celulares..... | 49 |
| 7.4 Desenvolvimento embrionário após Transferência Nuclear..... | 51 |
| 7.5 Desenvolvimento dos embriões após inovulação..... | 57 |
| 7.6 Análises de expressão gênica dos embriões clonados..... | 59 |
| 8. DISCUSSÃO..... | 62 |

| | |
|---|----|
| 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 70 |
| 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 72 |
| 11. ANEXOS..... | 79 |
| 11.1 Anexo A – Exame de DNA do animal BOV1 (Calidora), doador de células para realização da clonagem por transferência de núcleos..... | 79 |
| 11.2 Anexo B – Exame de DNA do clone bovino (Acácia) demonstrando completa similaridade com alelos do animal BOV1..... | 80 |

1. INTRODUÇÃO

As aplicações da clonagem vão muito além de produzir cópias idênticas de indivíduos geneticamente superiores. A clonagem por transferência nuclear é o método mais utilizado para se produzir clones em mamíferos e, embora as taxas de produção de embriões estejam cada vez maiores com o avanço dos estudos, a qualidade do embrião produzido e a sua capacidade de gerar animais vivos ainda permanece como um fator limitante para a aplicação desta biotecnologia em ampla escala.

Para se entender as causas dessa baixa taxa de sucesso na produção de animais clonados se faz necessário compreender os mecanismos epigenéticos que estão envolvidos no desenvolvimento desses embriões. O citoplasma recipiente deve ser capaz de desprogramar completamente o genoma das células doadoras de núcleo e reprogramá-las a um estado totipotente, capaz de gerar um novo indivíduo, primeiramente com as marcas embrionárias e, posteriormente com as marcas específicas dos tecidos. Essa reprogramação epigenética anormal pode levar a expressão gênica defeituosa.

Para se chegar a uma reconstrução epigenética mais próxima ao natural, a utilização de células menos diferenciadas e de drogas que auxiliem o processo de reprogramação pode contribuir para o sucesso no desenvolvimento do embrião após a transferência de núcleos.

Os principais mecanismos epigenéticos envolvidos na reprogramação do núcleo doador são a metilação do DNA e modificações nas proteínas histonas, dentre eles a acetilação. Para correta reprogramação epigenética deve-se obter um *status* hipometilado do DNA e hiperacetilado das histonas nos embriões clones. Desta maneira, a utilização de células menos metiladas como doadoras de núcleo parece ser uma boa alternativa para aumentar a eficiência da técnica.

Desde que se comprovou que as células-tronco embrionárias são mais eficientes em se produzir embriões clones do que tipos celulares altamente diferenciados, acredita-se que quanto menor o grau de diferenciação de uma célula, mais potencialmente ela será desprogramada pelo citoplasma receptor. Assim, as células-tronco mesenquimais, que podem ser obtidas de animais vivos, no fluido amniótico e tecido adiposo, surgem como uma promissora fonte de núcleos a serem utilizados na clonagem.

Para aumentar a eficiência da clonagem, o uso de drogas tanto nos meios de cultivo de células, quanto dos embriões vêm sendo estudado. A tricostatina A é uma droga inibidora de histonas desacetilases (HDACi), e assim age inibindo enzimas responsáveis por diminuir a acetilação das histonas, ou seja, levando o embrião a um estado hiperacetilado.

Embora a utilização de células menos diferenciadas conjuntamente com o uso de tricostatina A pareça ser uma boa combinação para melhorar a quantidade e qualidade de embriões produzidos por clonagem, isso ainda não havia sido testado. Desta forma, este trabalho buscou determinar o padrão de metilação de células-tronco mesenquimais e de fibroblastos da orelha de bovinos e testá-las na presença de tricostatina A para a produção de embriões clonados por meio de transferência nuclear e verificar a expressão de genes ligados a epigenética nos embriões produzidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS)

A Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) tem sido vista como uma biotecnologia promissora e poderosa em que as células somáticas terminalmente diferenciadas são reprogramadas com êxito em embrião totipotente pelo transplante de um núcleo doador em um ovócito enucleado (Wilmut et al., 1997, Polejaeva et al., 2000). De fato, o sucesso da técnica é comprovado pela geração de mais de 20 espécies diferentes de animais clonados até agora (Thuan et al., 2010).

Apesar de a TNCS ser uma promissora tecnologia com aplicações potenciais em pesquisa na transgenia, preservação de espécies, propagação de animais de produção, xenotransplantes em humanos, modelos de doenças humanas em animais e clonagem terapêutica (Wang et al., 2011), sua eficiência, ou seja, a quantidade de animais nascidos vivos comparado ao número de embriões transferidos, ainda é muito baixa. Segundo Iager et al. (2008) e Giraldo et al. (2008) a eficiência de produção de mamíferos clonados permanece menor que 10%, e, de uma forma mais abrangente, Thuan et al., (2010) afirmam que a eficiência da técnica nas diferentes espécies pode variar de 0-20%.

A maioria dos embriões/fetos produzidos por transferência nuclear é perdida em diferentes estágios da gestação, e sofrem de sérias anormalidades do desenvolvimento que são caracterizadas pela *large offspring syndrome* (LOS) (Beyhan et al., 2007).

A LOS é usada para descrever um número de malformações e doenças, o elevado peso ao nascimento é apenas uma dessas manifestações. De acordo com Vajta e Gjerris (2006), outros problemas já foram detectados em camundongos, bovinos e ovinos, tais

como anormalidades placentárias, hipóxia, falha respiratória, falta de vigor pós-natal, malformações no fígado e cérebro e falhas no sistema imunológico. Essa baixa eficiência limita significativamente as aplicações biomédicas e na agricultura da clonagem, principalmente aquelas relacionadas à transgenia (Cao et al., 2017), que utiliza como ferramenta a clonagem.

Várias vertentes são estudadas para o aprimoramento da técnica de TNCS, tais como fonte da célula doadora, qualidade do citoplasma receptor, passagem em cultivo da célula doadora no momento da clonagem e métodos de sincronização da célula doadora no estágio G0/G1 do ciclo celular. Porém, sabe-se que a reprogramação epigenética do núcleo doador é um dos fatores mais críticos determinando o sucesso da clonagem animal (Beebe et al., 2009). Sendo que para Cao et al., (2017) uma das estratégias mais comumente utilizadas envolve a aplicação de pequenas moléculas inibidoras para regular as modificações epigenéticas dos embriões clonados.

2.2 Epigenética

Dentre tantas definições para o termo epigenética na literatura, Iager et al. (2008) descreve como alterações na expressão gênica que não são devidas a alterações na sequência de DNA. Tomando essa definição como base, podemos entender como um único organismo vivo possui tantos tipos de tecidos diferentes se todas as células possuem o mesmo DNA, ou seja, as modificações epigenéticas são responsáveis pela derivação dos diversos tipos celulares com a mesma composição genética (Enright et al., 2003).

Existem vários mecanismos epigenéticos atuando no sentido de modificação da estrutura da cromatina. Essa estrutura é um dos principais fatores pelo qual o controle

do desenvolvimento na expressão de genes é estabelecido (Beyhan et al., 2007). As alterações gênicas incluem metilação de DNA e modificações nas caudas das histonas tais como metilação, acetilação e fosforilação (Iager et al., 2008).

2.2.1 Mecanismos de controle epigenético – Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma marca epigenética associada com a estrutura da cromatina na sua forma compactada e inativada (Bird e Wolffe, 1999). Em vertebrados, a metilação do DNA é caracterizada pela adição de um grupo metil na posição 5 das citosinas (5-metilcitosina), que ocorre principalmente no contexto dos dinucleotídeos citosina guanina (CpG) (Hendrich e Bird, 1998; Kurdyukov e Bullock, 2016). O padrão altamente metilado característico das células somáticas doadoras de núcleo tem um papel significativo nas anomalias epigenéticas observadas em animais clonados.

As consequências biológicas da metilação do DNA são mediadas pelas proteínas ligantes de metil-CpG, tal como a MeCP2, que, por sua vez, recrutam as histonas desacetilases (Bourc'his et al., 2001). Desta forma, pode-se dizer que há uma relação entre a metilação do DNA e outro mecanismo de regulação epigenética: a acetilação das histonas. O silenciamento do DNA gerado pela metilação e também pelas MeCP2 pode ser quebrado pelos inibidores de histonas desacetilases, criando uma cromatina remodelada e transcricionalmente ativa (Jones et al., 1998).

2.2.2 Mecanismos de controle epigenético – Hidroximetilação do DNA

Um outro mecanismo ainda pouco entendido e com significado biológico alvo de estudos é a presença de 5-hidroximetilcitosina (5-hmc) ligado aos sítios CpG do DNA. O surgimento do 5-hmc é resultado da oxidação do grupo 5-metilcitosina (5-mc) (Valinluck e Sowers, 2007). Uma vez que o padrão de metilação tenha se estabelecido

em uma célula de mamífero, esse padrão será transferido para as células-filhas. O mecanismo que garante a hereditariedade do padrão de metilação das células é a especificidade da DNA metiltransferase-1 (DNMT-1). Os dinucleotídeos CpG simetricamente metilados geram sítios hemimetilados após a replicação do DNA (Pradhan et al., 1999), e esses sítios hemimetilados são os substratos preferidos das DNMT-1 que irão regenerar simetricamente os sítios metilados. Entretanto, em um mecanismo proposto por Valinluck e Sowers (2007), quando ocorre a ligação do grupo 5-hmc ao dinucleotídeo CpG em uma das fitas de DNA antes da replicação, as DNMT-1 não irão regenerar esse sítio hidroximetilado, levando a uma perda de metilação em todas as células geradas a partir de então (Figura 1).

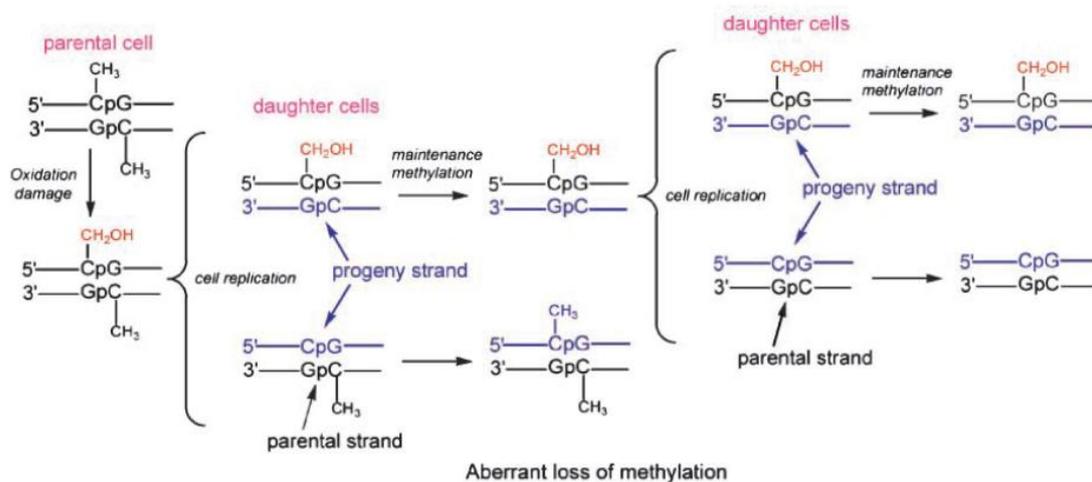


Figura 1. Mecanismo proposto para alterações na manutenção da metilação devido a alterações no DNA. A oxidação da 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina previne a metilação DNMT1 da citosina na fita oposta. A perda da atividade de metilação da DNMT1 na fita filha no sítio CpG oxidado resulta em perda de metilação no sítio CpG na célula filha. Fonte: Valinluck e Sowers, 2007.

Estudos tem mostrado que um novo olhar tem sido dado à hidroximetilação do DNA. Durante a reprogramação epigenética do zigoto, a perda do sinal de 5-mc no pró-núcleo paterno é coincidente com a aparição do 5-hmc (Wossidlo et al., 2011). Em

adição a isso, Ficz et al. (2011) demonstraram que em células-tronco embrionárias de camundongos, as regiões de eucromatina apresentaram uma forte presença de 5-hmc enquanto as regiões de heterocromatina foram altamente enriquecidas com 5-mc mas não 5-hmc, reforçando a associação entre hidroximetilação e transcrição gênica.

Em humanos, Valinluck and Sowers (2007) mencionaram a existência de uma família de proteínas, as *methyl-binding proteins* (MBPs), que se ligam com alta afinidade às sequências de DNA contendo 5-mc. Por sua vez, as MBPs recrutam HDAC que irá levar a condensação da cromatina e ao silenciamento do DNA subsequentemente. Em contraste, a oxidação da 5-mc em 5-hmc irá reverter a afinidade das MBPs, resultando em uma atividade transcricional, por não recrutar HDAC (Valinluck et al., 2004).

2.2.3 Mecanismos de controle epigenético – Acetilação das histonas

Outros mecanismos de modificação epigenética, além da metilação e acetilação do DNA, ocorrem no nível das proteínas histonas. A unidade fundamental da cromatina nos eucariontes é o nucleossomo, formado pelas proteínas histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4). As extremidades N-terminais de todas as histonas, com exceção da H1, se estendem na superfície do nucleossomo e podem sofrer várias modificações, alterando, por sua vez, a estrutura da cromatina (Strahl e Allis, 2000). Uma das principais modificações que a cromatina embrionária vai sofrer durante o desenvolvimento é a acetilação das moléculas de histona (Beyhan et al., 2007), que geralmente ocorre nos resíduos de lisina (Figura 2) (Lee et al., 2011).

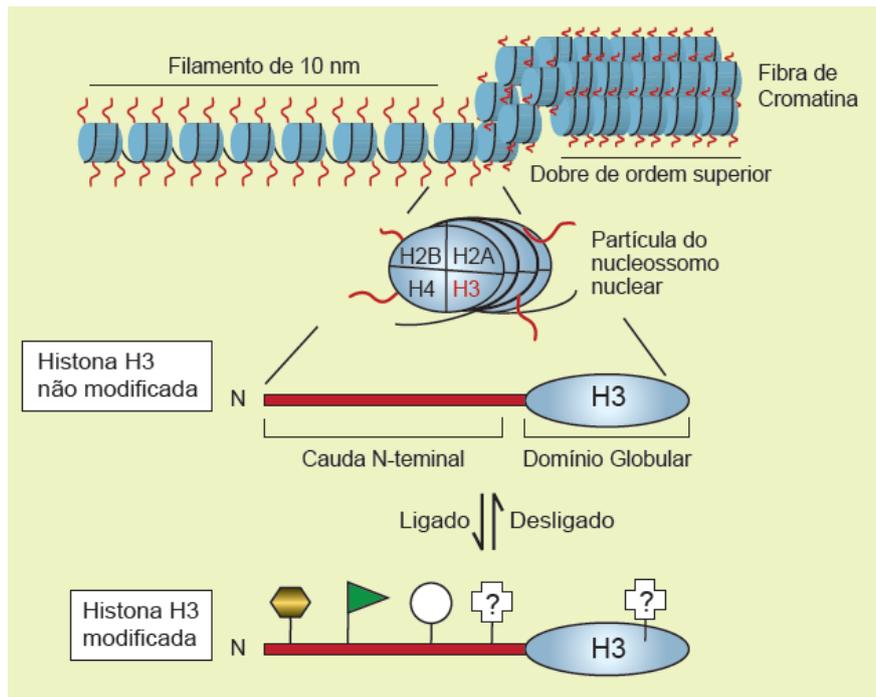


Figura 2. Organização da cromatina e cauda da histona H3. Assim como as caudas das outras histonas, o N-terminal da H3 (vermelho) representa um domínio altamente conservado que está susceptível a ser exposto ou prolongado para fora da fibra da cromatina. Várias modificações pós-traducionais distintas são conhecidas por ocorrer no N-terminal da H3, incluindo acetilação (bandeira verde), fosforilação (círculo branco) e metilação (hexágono amarelo). Outras modificações são conhecidas e podem ocorrer no domínio globular. Adaptado de Strahl e Allis, 2000. Fonte: Silva et al., 2016a.

Os níveis de acetilação das histonas são regulados por duas famílias de enzimas, as histonas acetiltransferases (HATs) que catalisam a adição de um grupo acetil ao resíduo de lisina, enquanto que as histonas desacetilases (HDACs) o removem (Figura 3) (Iager et al 2008). As HAT podem ser classificadas nos tipos A ou B, dependendo da sua localização subcelular, origem e função. A KAT2A é também conhecida por GCN5 e é uma HAT tipo A, que é encontrada no núcleo onde desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica por funcionar como um coativador transcricional (Lee et al., 2011).

Em geral, a desacetilação das histonas suprime a transcrição gênica, ou seja, a inibição das desacetilases resulta num aumento da acetilação global das histonas (Wang et al., 2011). Em outras palavras, acetilação das histonas é um mecanismo que facilita a transcrição, e a desacetilação tem efeito reverso na expressão gênica (Kang e Roh, 2011). No mínimo 10 HDAC de mamíferos já foram identificadas e são divididas em duas classes de acordo com o seu tamanho, homologia de sequência e interações proteína-proteína (Pazin e Kadonaga, 1997).

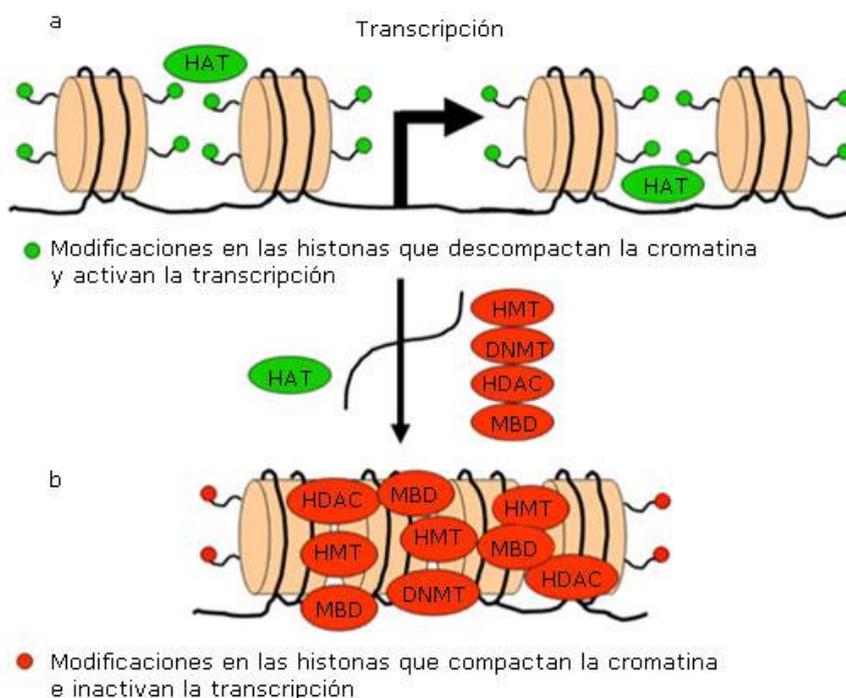


Figura 3. Regulação da atividade transcripcional pela modificação das histonas. As modificações pós-traducionais nas proteínas histonas são necessárias para regular a ativação ou a repressão à atividade transcripcional. a) As modificações nas histonas descompactam a cromatina e permitem o acesso a maquinaria transcripcional do DNA. Entre essas modificações está a acetilação das lisinas nas histonas H3 e H4 pelas histonas acetil transferases (HAT); b) Compactação das histonas, evitando o acesso da maquinaria transcripcional ao DNA. Entre os mecanismos mais importantes se encontram a desacetilação das lisinas nas histonas H3 e H4 pelas histonas desacetilases (HDAC). O início desse processo implica o recrutamento simultâneo das histonas metiltransferases (HMT), das DNA metiltransferases (DNMT) e das proteínas de união

a citocinas metiladas (MBD), levando ao silenciamento gênico. Fonte: Uribe Yunda e Mancera, 2014.

Alterações no *status* epigenético e no perfil de expressão gênica afetam todos os aspectos do desenvolvimento embrionário e por isso compreender e estudar com profundidade os mecanismos epigenéticos torna-se tão importante para o sucesso da TNCS, pois o mecanismo de reprogramação epigenética é totalmente alterado em embriões reconstruídos por transferência de núcleos.

2.3 Reprogramação epigenética na TNCS

Durante o desenvolvimento normal, os embriões iniciais sofrem uma série bem orquestrada de metilações de DNA e modificações nas histonas que tem um papel importante em estabelecer um estado permissivo para a expressão gênica embrionária inicial (Blelloch et al., 2006).

Em comparação às células somáticas, os gametas são menos metilados, com o DNA do espermatozoide sendo mais metilado que do ovócito (Howlett et al., 1991). Nos embriões fertilizados normalmente, mecanismos ativos e passivos apagam a maioria dos padrões de metilação dos gametas antes da implantação, de modo que as células do blastocisto sejam hipometiladas (Bourc'his et al., 2001). Novos padrões de metilação são estabelecidos após a implantação, e padrões defeituosos têm sido relacionados a situações patológicas (Xu et al., 1999).

Durante a fertilização, o genoma paterno exibe diferente dinâmica de perfil de acetilação de histonas. Após a fusão espermática com o ovócito, as protaminas são rapidamente trocadas por histonas originadas do citoplasma do ovócito. Em contraste a isso, o pró-núcleo materno exibe um aparecimento mais gradual das histonas acetiladas

(Dean et al., 2001). Devido a cromatina da célula somática ter seu próprio perfil epigenético, um padrão específico de acetilação e desacetilação é esperado após a TNCS (Cervera et al., 2009). A reprogramação atrasada ou incompleta do núcleo somático dentro do citoplasma do ovócito pode influenciar o curso normal dos eventos, pois um controle preciso ao longo do tempo da ativação do genoma embrionário é essencial para a embriogênese normal (Bourc'his et al., 2001).

Durante a clonagem, o núcleo somático carrega as modificações epigenéticas específicas do seu tipo de tecido, que deverão ser apagadas durante a reprogramação (Enright et al., 2003; Cervera et al., 2009). Tal reprogramação é o processo de retornar o núcleo somático diferenciado a um estágio totipotente para suportar o desenvolvimento e produção de todos os tipos de tecidos no indivíduo clonado (Enright et al., 2003).

Similar à remodelação do genoma espermático após a fertilização, as reações de reprogramação após a TNCS são iniciadas no citoplasma do ovócito recipiente imediatamente após a entrada da célula doadora (Oback, 2009). Entretanto, a cromatina nas células germinativas de fêmeas e machos é bem diferente em certos aspectos da cromatina nas células somáticas (Kim et al., 2003).

Bourc'his et al. (2001) observaram que embriões FIV sofrem uma desmetilação passiva de ambos os genomas parentais, e isso ocorre antes da primeira fase S do zigoto recém formado e continua por todas as divisões da clivagem. Já em embriões bovinos clonados nenhuma evidência do processo de desmetilação ativa foi observada, sendo que o núcleo somático permaneceu metilado antes da fase S.

A desmetilação passiva continua com uma eficiência grandemente reduzida nos embriões clonados (Bourc'his et al., 2001). A composição da cromatina somática pode desempenhar um papel significativo nessas anomalias, já que o processo de fusão introduz junto com o núcleo também a DNMT-1 (DNA metiltransferase de

manutenção) que não está normalmente presente nos embriões antes da implantação. Essa DNMT-1 pode estar trabalhando para perpetuar os padrões de metilação de célula somática nos embriões clones iniciais (Bourc'his et al., 2001).

Nos experimentos de Bourc'his e colaboradores (2001), o primeiro sinal de perda de metilação nos embriões clonados foi evidenciado no estágio de oito células do embrião, enquanto que nos embriões FIV isso ocorreu no estágio de quatro células. Além disso, as células dos blastocistos FIV de sete dias mostraram que os cromossomos estavam hipometilados em ambas as cromátides e mesmo as regiões de heterocromatina estava parcialmente metiladas, enquanto que nos clones a eucromatina das cromátides estava hipometilada, mas a heterocromatina dos centrômeros apresentava uma tendência a estar mais metilada que nos embriões normais, como pode ser observado claramente na Figura 4 (Bourc'his et al., 2001).

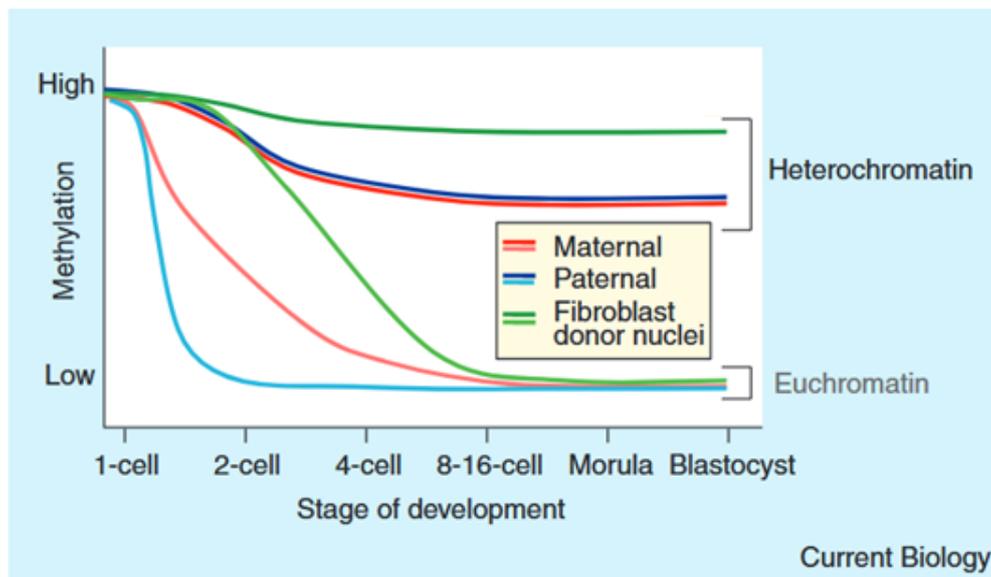


Figura 4. Reprogramação do padrão de metilação do DNA em embriões bovinos normais e clonados, de acordo com Bourc'his et al., 2001. Os níveis de metilação da heterocromatina (cores mais escuras) e eucromatina (cores mais claras) nos embriões bovinos normais diminuem através do desenvolvimento pré-implantacional, deixando o blastocisto hipometilado, apesar da heterocromatina do centrômero permanecer parcialmente metilada. Os cromossomos dos embriões clonados (em verde) mostram

uma desmetilação passiva ocorrendo antes do estágio de 8-16 células. As sequências de heterocromatina nos blastocistos clonados retêm mais altos níveis de metilação do que de embriões normais. Fonte: adaptada de Fairburn et al., 2002.

Essa persistência de alto nível de metilação na heterocromatina no centrômero também pode ser uma fonte de alteração da atividade embrionária inicial, pois a heterocromatina tem sido envolvida em silenciamento gênico em mamíferos e outros organismos (Shogren-Knaak et al., 2006; Smith, 2008). Comparados aos embriões normais, o genoma dos clones parece ser uma mistura de sequências de metilação normais e aberrantes (Bourc'his et al., 2001).

A pobre sobrevivência dos embriões clonados é devida, atualmente, a esta natureza imprevisível na reprogramação nuclear induzida após transferência de núcleos (Oback, 2009), já que as células somáticas de mamíferos mostram níveis elevados de metilação do DNA (Bourc'his et al., 2001).

Dessa forma, a baixa eficiência do desenvolvimento pós-implantacional dos embriões clonados a partir de células diferenciadas é causada, ao menos parcialmente, por remodelação ou reprogramação inadequada do núcleo doador (Wang et al., 2011; Whitworth et al., 2015), levando a defeitos na expressão gênica inicial (Blelloch et al., 2006) e expressão deficiente dos genes envolvidos na manutenção da pluripotência (Cervera et al., 2009). Essas modificações epigenéticas e consequentes padrões de expressão de genes anormais estão associados com a baixa taxa de sucesso global da clonagem (Kishigami et al., 2006; Wee et al., 2007).

Devido o genoma do zigoto formado ser essencialmente o mesmo que o da célula somática doadora (embora epigeneticamente diferentes), torna-se claro que a regulação epigenética tem um papel muito importante no processo de reprogramação da célula somática na TNCS (Cervera et al., 2009).

Desta forma, após o entendimento de que a reprogramação epigenética é um processo chave no sucesso da TNCS, muitos estudos têm sido voltados no sentido de buscar alternativas que facilitem esse mecanismo e levem a maiores taxas de sucesso na clonagem. Duas vertentes podem ser destacadas com esse intuito: o uso de células menos diferenciadas como doadoras de núcleo para facilitar a reprogramação a um *status* embrionário e a utilização de drogas que auxiliem a correta remodelação da cromatina nos embriões clones.

2.4 Drogas modificadoras da cromatina

Devido à crescente evidência da desregulação epigenética nos embriões TNCS, o uso de modificadores da cromatina tem sido de interesse para facilitar a reprogramação nuclear e reduzir as anormalidades epigenéticas vistas nos clones (Iager et al., 2008). Acredita-se que a diminuição da metilação e o aumento da acetilação alteram a estrutura da cromatina, e subsequentemente melhoram a competência do desenvolvimento de embriões clonados (Oh et al., 2012).

Assim, a busca por drogas que atuem reduzindo a metilação e aumentando a acetilação tanto nas células doadoras quanto nos embriões clonados passaram a ser foco de estudos para auxiliar a maquinaria endógena modificadora do epigenoma e aumentar a velocidade e extensão da reprogramação nuclear (Schmittgen e Livak, 2008) e, por consequência, melhorar a eficiência da clonagem.

Mais especificamente, a eficiência da TNCS foi melhorada com introdução de drogas inibidoras de histona desacetilases (HDACi) (Whitworth et al., 2015), tanto na ativação como no cultivo dos embriões reconstruídos (Oh et al., 2012). Porém, Akagi e colaboradores (2011) afirmam que ainda não está claro como o tratamento com HDACi

melhora a competência do desenvolvimento dos embriões TNCS. Uma possível explicação é que HDACi pode levar a correção de modificações epigenéticas anormais, seguida pela expressão normal de alguns genes relacionados ao desenvolvimento (Akagi et al., 2011), já que a inibição de HDAC levará a um aumento dos níveis globais de acetilação das histonas, facilitando a transcrição de uma forma generalizada (Cervera et al., 2009).

Existe uma ampla variedade de HDACi de origem natural e sintética, dentre eles podemos citar ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA), Scriptaid (Whitworth et al., 2015), Apicidin (Darkin-Rattray et al., 1996), butirato de sódio (Liu et al., 2012), tricostatina A (Sawai et al., 2012). A maior questão a respeito da terapia transcricional com HDACi é a esperada toxicidade desses componentes (Nervi et al., 2001).

A tricostatina A (TSA), um produto natural de *Streptomyces hygroscopicus* (Withsorth et al., 2015) está entre os mais potentes, estáveis e altamente específicos inibidores de HDAC (Nervi et al., 2001). A droga tem sido usada no tratamento das células doadoras de núcleo e também no cultivo embrionário após a fusão do núcleo somático com o ovócito enucleado.

Existe uma correlação entre o nível de acetilação e a atividade transcricional da cromatina em que as histonas hiperacetiladas são associadas com domínios transcionalmente ativos enquanto histonas hipoacetiladas são principalmente associadas com regiões da cromatina silenciadas (Beyhan et al., 2007). A TSA, por ser uma HDACi, atua causando hiperacetilação das histonas e, conseqüentemente, melhorando o desenvolvimento de embriões após a TNCS.

Segundo Kishigami et al. (2006), o tratamento com TSA na clonagem somática traz o núcleo somático transferido próximo ao núcleo de célula-tronco embrionária. Tratando-se especialmente a célula doadora, houve melhoria na taxa de

desenvolvimento de embriões em bovinos, que pode ter sido resultado de se apagar as marcas epigenéticas pré-existentes nas células doadoras antes da TNCS (Enright et al., 2003). Além disso, a TSA, usada por quatro horas durante a ativação química, também aumentou os níveis de expressão de genes ligados à pluripotência (Nanog e Oct4) em embriões clonados comparados aos embriões controle (Oh et al., 2012).

Alguns trabalhos também verificaram e demonstraram o efeito positivo na desmetilação do DNA que a TSA exerce (Kang e Roh, 2011), o que também ajudaria na eficiência de produção de embriões corretamente reprogramados, já que o núcleo de célula somática diferenciado está em estado altamente metilado (Wee et al., 2007).

Apesar dos efeitos benéficos óbvios da TSA na eficiência da clonagem em algumas espécies, a concentração e o tempo de exposição ótimos para tratamento com TSA ainda não estão claros (Oh et al., 2012). Altas concentrações ou longo tempo de exposição ao tratamento com TSA levaram a reduções significativas nas taxas de sucesso da clonagem, sugerindo que uma overdose de TSA possa causar defeitos de desenvolvimento após a implantação (Kishigami et al., 2006).

Neste sentido, existe ampla variação de testes com diferentes concentrações de TSA por diferentes períodos de tempo, porém a variabilidade de tipos celulares testados ainda é limitada. Akagi et al. (2011) concordam que o tratamento com HDACi melhora as taxas de formação de blastocistos, entretanto as condições ótimas para este tratamento podem variar entre as linhagens de células doadoras. Corroborando com essas informações Kishigami et al. (2006) observaram uma melhora na clonagem com uso da TSA nas células do *cumulus*, fibroblastos, baço e células-tronco neurais, porém o resultado não foi tão satisfatório quando foi realizado nas células-tronco embrionárias. Desta maneira, torna-se necessário investigar o tempo ótimo de exposição e concentração de HDACi em cada linhagem celular usada como doadora na TNCS.

2.5 Células-tronco mesenquimais

A diferenciação é um processo altamente regulado pelo qual as células se tornam especializadas a desempenhar funções específicas e perdem a habilidade de desempenhar outras funções (Oback, 2009). Sendo que a reprogramação eficiente do núcleo somático doador no citoplasma é amplamente dependente do *status* epigenético do núcleo inserido (Li et al., 2008).

As células-tronco podem ser divididas em células-tronco embrionárias e células-tronco adultas de acordo com a sua fonte. Células-tronco embrionárias, conhecidas como células-tronco totipotentes, podem teoricamente se diferenciar em todos os tipos celulares *in vivo* e *in vitro*. As pesquisas com células-tronco embrionárias têm sido amplamente restritas por causa da dificuldade em obter as células, rejeição imunológica, e questões éticas e morais. Células-tronco adultas são células indiferenciadas que existem em tecidos diferenciados de um indivíduo maduro. Elas tem a habilidade de auto-renovação e diferenciação pluripotente e são facilmente obtidas, sendo que o autotransplante, por exemplo, pode ser realizado (He et al., 2016).

Está claro que o uso de células-tronco embrionárias aumenta a eficiência da clonagem (Wakayama et al., 1999; Jaenisch et al., 2002; Oback, 2009). Portanto, é possível que o uso de outros tipos de células-tronco pluripotentes tenham uma vantagem sobre os tipos celulares mais diferenciados em produzir embriões clonados com maior eficiência e menos anormalidades (Secher et al., 2017). A possibilidade de isolamento de células-tronco mesenquimais de origem fetal e adulta abre uma nova possibilidade de utilização dessas células na TNCS.

As células-tronco mesenquimais - CTM (*mesenchymal stem cell*, MSC), também chamadas de células progenitoras mesenquimais (Karahuseyinoglu et al., 2007),

representam um arquétipo das células-tronco somáticas multipotentes. As MSC são uma promessa para aplicação na medicina regenerativa em humanos (Wagner et al., 2005) e também em animais domésticos (Cremonesi et al., 2011), principalmente devido sua capacidade intrínseca de auto-regeneração e diferenciação em tipos celulares funcionais (Baksh et al., 2004).

Novas fontes de MSC foram descobertas e estão sendo estudadas, incluindo o fluido amniótico e o tecido adiposo (Silva et al., 2016b) e embora tenham sido testadas em muitos trabalhos quanto à sua capacidade terapêutica para reparar ou regenerar órgãos (Ghorbani et al., 2014), seu uso na TNCS bovina é muito recente (Silva et al., 2016).

A caracterização das células quanto a sua origem mesenquimal está ligada a algumas condições, como sua característica plástica-aderentes quando em cultivo, presença de padrão de expressão de antígenos de superfície (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105) e ausência de expressão de marcador hematopoiético (CD34) e do antígeno comum de linfócitos (CD45). Esses marcadores são descritos como essenciais para afirmar que as células-tronco são de origem mesenquimal (Abdulrazzak et al., 2010). Além disso, as células devem apresentar capacidade de diferenciação em, pelo menos, osteócitos, condrócitos e adipócitos, como Pittenger et al. (1999) descreveu como um outro fator essencial para a caracterização das CTMs.

A mesma classificação (marcadores) foi válida para classificar MSC de diferentes fontes e diferentes espécies, tais como: tecido de granulação periodontal (periodontal granulation tissue) em humanos (Zaganescu et al., 2015); células da geléia de Wharton em búfalos (Sreekumar et al., 2014); membrana amniótica em suínos (Lange-Consiglio et al., 2015); medula óssea de equinos e tecido adiposo de cães (Clark et al., 2016); fluido amniótico em humanos (Benavides et al., 2012; Rota et al., 2012);

tecido adiposo em humanos (Ahrari et al., 2013); medula óssea de bovinos (Lu et al., 2013); tecido adiposo e fluido amniótico em bovinos (Silva et al., 2016a); geléia de Wharton de bovinos (Cardoso et al., 2012, 2017; Silva et al., 2016b, 2016c).

Neste trabalho hipotetiza-se que a associação de uma célula-tronco mesenquimal que, supostamente, possui menos marcas epigenéticas com uma droga – a Tricostatina A - que leva o embrião a um estado hiperacetilado e hipometilado resulte em melhores taxas de desenvolvimento embrionário em laboratório e após a implantação no útero materno.

2.6 Associação de célula doadora e droga inibidora de HDAC

O uso da TSA possui várias descrições em trabalhos na literatura, entretanto, na maioria das vezes associada aos fibroblastos, tipo celular classicamente utilizado na clonagem. Fica claro também que existe um tempo de exposição e uma concentração ótima da droga a ser utilizada, e que essa combinação pode variar em decorrência do tipo celular utilizado como doador de núcleo.

Kishigami et al (2006) foram quem primeiro relataram a melhora da TN com o uso de TSA em camundongos. Tratamentos com 5, 50 ou 500 nM por 10 h foram semelhantes na produção embrionária. Enquanto que Lee et al. (2011) realizaram um teste com várias concentrações de TSA por variados tempos de exposição à droga. Os autores testaram 0,5, 5, 50 e 500 nM de TSA por 5, 10, 20 e 40 h no cultivo embrionário. Os resultados mostraram que o tratamento com 50 nM foi o que apresentou o desenvolvimento *in vitro* mais eficiente ao estágio de blastocistos bovinos.

Sawai et al. (2012) utilizaram 5 e 50nM de TSA para tratar embriões clonados com fibroblastos bovinos utilizados como doadores de núcleo pelo tempo de 14 horas.

Sendo que o tratamento com 5 e 50nM de TSA foram semelhantes quanto a capacidade de produção embrionária e somente o tratamento com 50 nM foi superior quando comparado ao tratamento sem TSA.

Akagi et al. (2011) utilizaram várias concentrações de TSA, sendo que 5nM de TSA por 20h foi a superior para a formação de blastocistos, embora as taxas de blastocistos fossem muito semelhantes entre este tratamento (29%) e do tratamento com 50nM (26%).

Beebe et al., (2009), ao tratar embriões suínos com 50nM TSA por 24h, aumentaram taxa de blastocisto no D6 (64%) comparado ao controle (20%). Cao et al., (2017), também trabalhando com a espécie suína, mostram que o uso de TSA 50nM por 24h melhorou significativamente a produção de blastocistos quando comparado ao controle sem TSA.

Para muitos autores está claro que a inibição das HDAC durante a reprogramação aumenta a acetilação e altera a expressão gênica, entretanto um padrão claro de quais alterações são importantes não tem sido bem estabelecido (Whitworth et al., 2015). Realizar uma análise molecular mais aprofundada dos embriões produzidos por transferência nuclear garante, como por exemplo a avaliação de expressão gênica, leva-nos a um maior entendimento da ação da droga HDACi e se este tratamento está realmente sendo efetivo.

3. JUSTIFICATIVA

Perante as baixas taxas de desenvolvimento embrionário pós-implantacional e poucos nascimentos de animais vivos e saudáveis obtidos por meio de clonagem por transferência nuclear em bovinos, este projeto visa apresentar uma alternativa de uso de células-tronco mesenquimais aliadas a uma droga inibidora de acetiltransferases. Sabe-se que, na transferência nuclear, quanto menos marcas epigenéticas a célula doadora de núcleo apresentar, mais facilmente ela será reprogramada para estabelecer o padrão epigenético embrionário totipotente. E que falhas na desprogramação e reprogramação das células resultam nas anormalidades frequentemente observadas nos bezerros clones nascidos. Também é conhecido que células-tronco embrionárias são mais eficientes que células somáticas diferenciadas em desenvolver embriões clones, porém a utilização de células-tronco embrionárias é limitada tanto por questões éticas quanto por dificuldade no cultivo desse tipo celular. A recente descoberta de populações de células-tronco mesenquimais residindo em tecidos facilmente obtidos de animais vivos, torna a utilização dessas células atraente na clonagem, pois hipotetiza-se que também carreguem menos marcas epigenéticas que outras células mais diferenciadas. Desta forma, propomos a análise do perfil epigenético das células-tronco mesenquimais e sua utilização conjunta com uma droga inibidora de histona desacetilase que também atuará em nível de reprogramação epigenética, a tricostatina A, no sentido de aumentar a acetilação nos embriões, objetivando a obtenção de um embrião clone com *status* epigenético mais próximo ao natural.

4. HIPÓTESE

A associação de células doadoras de núcleo menos metiladas com uma droga que leve o embrião a um estado hiperacetilado resulta em melhores taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* e *in vivo* e altera a expressão de genes ligados à epigenética?

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivos gerais

Testar o efeito da Tricostatina A no cultivo de embriões bovinos clonados utilizando células-tronco mesenquimais provenientes do fluido amniótico e do tecido adiposo como doadoras de núcleo.

5.2 Objetivos específicos

Realizar a caracterização das células isoladas como células-tronco mesenquimais através de determinação de marcadores de superfície celular e diferenciação das células em três linhagens celulares (adipogênica, osteogênica e condrogênica);

Determinar o padrão de metilação global das células isoladas;

Determinar o nível de expressão gênica de marcadores de pluripotencialidade nas células isoladas;

Realizar transferência nuclear com células tronco mesenquimais tratadas ou não tratados com a TSA;

Acompanhar o desenvolvimento embrionário e fetal a partir de transferências embrionárias *in vivo*;

Determinar o nível de expressão gênica de HDAC 1 e 3, HAT 1 e KAT2A em embriões tratados e não tratados com a TSA por 20 h.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Ética na experimentação

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Embrapa sob o número de protocolo 578-2886-2/2017 e da Universidade de Brasília, sob o número de protocolo 151101/2013.

6.2 Local

O experimento foi realizado no Centro de Tecnologias em Raças Zebuínas Leiteiras - CTZL, fazenda experimental da Embrapa Cerrados e na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Todos os centros são localizados em Brasília, Distrito Federal.

6.3 Isolamento *in vivo* e cultivo *in vitro* dos diferentes tipos celulares

6.3.1 Isolamento das células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA)

Foram estabelecidas duas gestações de animais da raça Gir para obtenção dos três tipos de células. Para isolamento das células do fluido amniótico nos animais no período gestacional entre 60 e 74 dias, um procedimento de amniocentese transvaginal adaptada foi realizado como descrito a seguir. A região da vulva e vagina de cada animal foi desinfetada com álcool 70%, após a indução de anestesia epidural com lidocaína 2%. A vagina sofreu anti-sepsia com solução de Kilol®-L e em seguida um transdutor convexo de 7,5 MHz conectado a um ecógrafo Honda (HS-1500V) foi

coberto com uma camisinha sanitária bovina e introduzida até o fundo vaginal. Em seguida, o útero foi retraído manualmente através do reto, para que o corno gestacional ficasse justaposto com a parede da vagina. O transdutor foi equipado com uma agulha de 21 g com comprimento de 65 cm, localizada na ponta da sonda. Todo procedimento foi monitorado através da imagem do ultrassom, para um correto posicionamento entre a vesícula amniótica-alantoideana e a guia da agulha. Quando a área não ecogênica, representando líquido amniótico foi observada claramente no monitor, a ponta da agulha foi inserida por um técnico auxiliar, sob a coordenação do operador do ultrassom. Após a penetração da parede vaginal, a agulha foi introduzida na vesícula amniótica-alantoideana, tendo o cuidado de não atingir o feto.

Logo que a agulha atingiu o líquido amniótico, cerca de 4 a 9,5 mL de fluido amniótico foi aspirado com o auxílio de uma seringa estéril de 60 mL. A correta localização foi definida pela confirmação das imagens das partes do corpo fetal, membranas alanto-amniótica e alanto-coriônica e parede uterina (Figura 5). Procurou-se aspirar uma quantidade mínima de líquido amniótico para que a prenhez fosse mantida.



Figura 5. A) Sistema utilizado para aspiração *in vivo* de líquido amniótico; B) Imagem ultrassonográfica demonstrando o correto posicionamento do feto no momento da coleta do líquido amniótico, as três linhas tracejadas apontam a orientação da saída da agulha.

O material foi levado ao laboratório, centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi resuspenso em 1 mL de meio Amniomax Complete II (Gibco-BRL/Life Technologies, Rockville, MD, EUA). As células foram cultivadas em placas de seis poços com mais 1 mL de meio em estufa com 5% de CO₂, 90% de umidade e temperatura de 38,5°C. O crescimento celular foi observado após uma semana de incubação.

Após a coleta do fluido amniótico, as gestações prosseguiram normalmente sem prejuízo para o feto.

6.3.2 Isolamento das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA)

O isolamento das células do tecido adiposo foi realizado nos dois bezerros (os mesmos das gestações que se retirou o líquido amniótico) quando eles atingiram dois meses de idade. Uma biópsia elíptica de pele e tecido subcutâneo com tecido adiposo foi retirada na região perineal das duas bezerras (BOV1 e BOV2), abaixo do ânus e acima da vulva (Figura 6), após indução de anestesia epidural com lidocaína 2%. Da mesma biópsia coletara tentou-se realizar o isolamento dos fibroblastos da pele, entretanto, essa tentativa não obteve sucesso e optou-se pelo isolamento dos fibroblastos provenientes da pele da orelha, posteriormente.

Após a coleta, as biópsias foram imediatamente imersas em solução de Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) aquecida a 37°C contendo gentamicina (0,05mg/mL), estreptomicina (0,25mg/mL), penicilina (250UI/mL) e nistatina (24µL/mL) e enviadas para o laboratório.



Figura 6. Coleta das biópsias em região perineal de bovino para isolamento das células do tecido adiposo.

No laboratório, as biópsias de tecido adiposo foram separadas da pele e cortadas em pequenos fragmentos (cerca de 1 mm^2) e depositados no fundo de placa de Petri para aderência do material. Após alguns minutos para o estabelecimento do contato entre a placa e o material biológico, foram adicionados 3 mL de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) acrescido de 10% de SFB, gentamicina, penicilina, estreptomicina e nistatina nas mesmas concentrações já citadas utilizadas para o DPBS, para cobrir todas as biópsias. As placas foram transferidas cuidadosamente para incubadora estabilizada a $38,5^\circ\text{C}$ contendo 5% de CO_2 e umidade elevada. Após o cultivo por sete dias, as biópsias foram retiradas, o meio trocado, e as células isoladas foram cultivadas por mais sete dias nas mesmas condições. Após este período, as células isoladas no fundo da placa foram resuspensas pela ação de tripsina (0,25%) e depositadas em garrafas de cultivo para aumentar seu número e atingirem confluência celular para então serem criopreservadas e utilizadas posteriormente na transferência nuclear ou para se proceder as avaliações.

6.3.3 Isolamento dos fibroblastos de pele da orelha (FIB)

Fibroblastos da orelha foram isolados para serem utilizados como controle nos procedimentos de TNCS e metilação global. Os fibroblastos foram isolados da orelha dos mesmos animais em que se procedeu a coleta do tecido adiposo e do fluido amniótico.

Para o isolamento, uma biópsia da orelha dos mesmos animais com um ano de idade (Figura 7) foi coletado mediante anestesia local prévia, realizada com cloridrato de lidocaína 2%. O fragmento da orelha de 3 cm de comprimento e 2 cm de largura (Figura 8A) foi levado ao laboratório, onde a pele foi separada da cartilagem (Figura 8B) e cortada em pequenos fragmentos de 1 mm², os quais foram cultivados por meio de explante em meio DMEM acrescido de 10% de SFB, antibióticos e nistatina (Figura 8C). O cultivo foi o mesmo descrito para as células do tecido adiposo.



Figura 7. Fêmeas bovinas da raça Gir Leiteiro com um ano de idade em que se procedeu a coleta das células do fluido amniótico, células do tecido adiposo e fibroblastos. A) Animal BOV1; B) Animal BOV2.

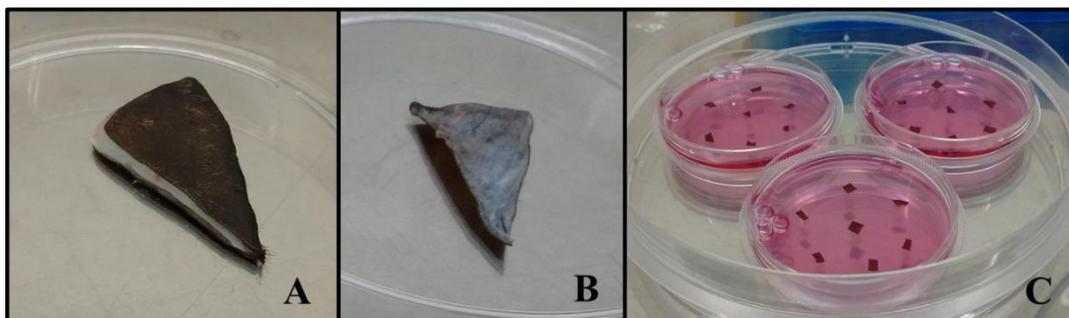


Figura 8. Coleta e cultivo de biópsia de pele para isolamento de fibroblastos bovinos. A) Biópsia de pele e cartilagem de orelha; B) Fragmento de pele separado da cartilagem; C) Fragmentos de biópsia de pele da orelha acrescidos de meio de cultivo celular.

6.4 Criopreservação das células

As CTM-TA e os FIB isolados e cultivados foram criopreservadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). E as CTM-FA isoladas *in vivo*, foram congeladas em Amniomax complete II, suplementado com 10% de DMSO.

Quando atingiram o estado de confluência, as células em cultivo foram tratadas com tripsina-EDTA durante 5 minutos. Após o desprendimento do fundo da placa de cultivo, as células suspensas foram centrifugadas a 2000 g por 5 minutos. O sedimento obtido foi resuspenso com a solução crioprotetora. Em seguida, as células, em uma concentração aproximada de 1×10^5 células/mL, foram alocadas em palhetas de 0,25 mL e armazenadas em freezer -80°C por 24 horas e finalmente mergulhadas em nitrogênio líquido. As palhetas foram acondicionadas em botijões criogênicos, onde permaneceram armazenadas até o momento de realizar o novo cultivo para transferência nuclear ou para análise de metilação global.

6.5 Caracterização das células-tronco mesenquimais

As células do fluido amniótico e do tecido adiposo foram mantidas em cultivo até a 11ª passagem e, então, foram caracterizadas para a presença de marcadores celulares (fenotipagem) (Tabela 1) e pluripotência, e quanto à habilidade de diferenciação em células adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas.

Tabela 1. Especificações dos anticorpos primários utilizados na citometria de fluxo para caracterizar as células-tronco mesenquimais.

| | Clone | Anticorpo | Diluição | Espécie | Fabricante |
|-------|--------------|------------------------------|-----------------|----------------|-------------------|
| CD34 | 5AE | Precursor hematopoiético | 1:50 | Camundongo | Sigma-Aldrich® |
| CD45 | MEM-28 | antígeno comum de linfócitos | 1:50 | Camundongo | Sigma-Aldrich® |
| CD90 | 5E-10 | Anti-THy1 | 1:50 | Camundongo | Sigma-Aldrich® |
| CD105 | MEM-226 | Anti-endoglina | 1:50 | Camundongo | Sigma-Aldrich® |
| CD29 | MEM-101A | Anti-integrina β 1 | 1:50 | Camundongo | Sigma-Aldrich® |
| CD73 | 4D3 2G10 | Anti-nucleotidase | 1:25 | Camundongo | Sigma-Aldrich® |

A fenotipagem foi realizada usando citometria de fluxo. As células foram incubadas com os anticorpos primários CD29, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, considerados importantes para caracterizar a origem mesenquimal das células tronco. Logo após as células foram lavadas com PBS adicionado de 0,1% de Triton X-100. Após a lavagem, uma diluição de 1:25 (CD73) ou 1:50 (CD29, CD34, CD45, CD90, CD105) de anticorpos secundários, representados pelos anticorpos caprinos anti-camundongo marcado com FITC (Sigma-Aldrich), foi adicionada a 100 μ l de suspensão celular, e foram incubadas a 37°C por 30 min. O núcleo das células foi corado com o corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). A suspensão de células foi lavada como descrito anteriormente, e após a lavagem final, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído. Para o controle foram utilizadas células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney).

Os dados foram adquiridos e quantificados de acordo com os valores médios obtidos (células imunoreativas) mais o desvio padrão produzido pelo software do equipamento Attune (Applied BiosystemsW, Foster City, CA, EUA). O padrão negativo foi examinado pela aplicação da mesma suspensão celular com a primeira incubação, e o resultado foi incluído na compensação para excluir a auto fluorescência.

As diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (meios de diferenciação STEMPRO®, Invitrogen, EUA). Para os procedimentos de diferenciação as células foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/mL em placas de seis poços, sob as mesmas condições de cultivo descritas acima. Após o cultivo por 48 h, o meio foi trocado pelo meio STEMPRO® (2 mL/poço) para diferenciação osteogênica, e a cada quatro dias era trocado por meio novo. Após 20 dias de diferenciação, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich), e a mineralização pelo cálcio foi acessada pela coloração de *Alizarin Red* (Sigma-Aldrich).

Para a diferenciação adipogênica, 1×10^6 células/mL foram plaqueadas nas mesmas condições descritas para a diferenciação adipogênica. O meio de cultivo foi trocado por 2 mL do meio de diferenciação adipogênica STEMPRO®, que foi, então, trocado a cada 24 h. Após 15 dias de diferenciação, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e coradas com a solução de *Oil Red* (Sigma-Aldich) (0,3% de pó de Oil Red dissolvidos em isopropanol 60%) por 10 minutos. Depois disso, as células foram lavadas com isopropanol 60%. A indução da diferenciação adipogênica ficou aparente pelo acúmulo de vacúolos lipídicos intracelulares que foram corados pelo *Oil Red*.

Para induzir a diferenciação condrogênica, condições de cultivo similares foram seguidas como descritas para as induções adipogênica e osteogênica. Entretanto, 3×10^6

células/mL foram cultivadas, e o meio de diferenciação STEMPRO foi suplementado com 100 µL de indutor condrogênico (Invitrogen). As células permaneceram sob essas condições de cultivo por uma semana, sendo o meio trocado a cada 24 h. as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e coradas com Safranina O (Sigma-Aldrich) para corar os glicosaminoglicanos.

Após a indução nos diferentes tipos celulares, as células foram mantidas a -86°C até a análise molecular de microarranjo, que foi realizadas de acordo com Cardoso et al. (2017). O RNA total foi isolado das CTM-FA e CTM-TA (5×10^5 células) em triplicata após a tripsinização, de acordo com o manual do fabricante Qiagen RNeasy System™ (Qiagen, Hilden, Germany). O RNA total foi tratado com DNase e reversamente transcrito em DNA complementar (cDNA) usando o Superscript III (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). O arranjo Axiom® Genome-Wide BOS 1 foi usado para as análises de transcriptoma (Affymetrix, Santa Clara, CA). Após hibridização, os chips de genes foram lavados e corados com SA-PE. A leitura foi realizada em um scanner de estação fluida Affymetrix Gene Chip. Os genes analisados, correspondentes aos marcadores positivos de CTM, genes imuno relacionados e pluripotência de CTM, estão detalhados na Tabela 2. A expressão média foi calculada, e transformada para Log2 para cada gene pelo software Affymetrix Microarray Suite 5.0.

Tabela 2. Especificações do nome dos genes bovinos (*Bos taurus*) marcadores positivos de pluripotencialidade de células-tronco, sua descrição e localização pesquisados por microarranjo e qRT-PCR.

| Símbolo do gene/ID | Descrição | Localização |
|---------------------------|--|-----------------------------|
| <i>LEP</i> | 280.836 Leptin | Chromosome 4, AC_000.161.1 |
| <i>FABP4</i> | 281.759 Fatty acid-binding protein 4, adipocyte | Chromosome 14, AC_000.171.1 |
| <i>PPARD</i> | 353.106 Peroxisome proliferator-activated receptor delta | Chromosome 23, AC_000.180.1 |
| <i>COL1A1</i> | 282.187 Collagen type 1, alpha 1 | Chromosome 19, AC_000.176.1 |
| <i>SOX9</i> | 353.115 SRY (sex-determining region Y)-box 10 | Chromosome 5, AC_000.162.1 |
| <i>GFAP</i> | 281.189 Glial fibrillary acidic protein | Chromosome 19, AC_000.176.1 |
| <i>NES</i> | 522.383 Nestin | Chromosome 3, AC_000.160.1 |
| <i>OMD</i> | 280.885 Osteomodulin | Chromosome 8, AC_000.0149.1 |
| <i>POST</i> | 281.960 Osteoblast-specific factor | Chromosome 12, AC_000.034.1 |
| <i>OSTF1</i> | 281.961 Osteoclast-simulating factor 1 | Chromosome 8, AC_000.0610.1 |

6.6 Padrão de metilação e hidroximetilação global das células

6.6.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico de todas as células foi extraído de acordo com o protocolo *salting out* (Wu et al., 2011). As células foram retiradas das garrafas de cultivo com auxílio de tripsina e lisadas por 10 min a 55°C com solução de lise nuclear (50mM Tris pH 7,8; 25 mM EDTA; 400 mM NaCl; 1% SDS). Após a lise, foi adicionada a solução de precipitação de proteína (6 M NaCl) e as amostras foram agitadas por 30 segundos e incubadas em gelo por mais 5 min. Após centrifugação, o sobrenadante, que continha o DNA, foi misturado com isopropanol e incubado *overnight* a -20°C, para recuperação do DNA genômico por precipitação. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 14000 g por 30 min a 4°C e o pellet foi lavado com etanol 70%. Após lavagem, todo etanol foi removido por centrifugação e secagem. Os álcoois precipitam o DNA e deixam no sobrenadante tudo que não for DNA. O pellet foi reidratado com TE (10 mM Tris pH 7,8; 1 mM EDTA) e incubado a 55°C por 1 h. Após esta última incubação as amostras encontravam-se prontas para serem utilizadas ou para serem armazenadas a -20°C.

Para mensuração da pureza e quantidade de DNA por observação, as amostras foram submetidas à eletroforese em corrente elétrica constante de 50 mA em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (10 mg/mL) em meio TBE 0,5 X. Utilizou-se o marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O gel foi fotografado em um fotodocumentador Image Capture 300® (GE). Em seguida as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® (ND-100) (Thermo Scientific, Asheville, NC, EUA).

6.6.2 Metilação e hidroximetilação global

Para mensuração da metilação e hidroximetilação global dos fibroblastos, células do tecido adiposo e do fluido amniótico coletadas dos dois animais, foram utilizados os seguintes Kits, respectivamente: MethylFlash™ Methylated DNA Quantification (Colorimetric) e o MethylFlash™ Hydroxymethylated DNA Quantification (Colorimetric) (Epigentek). As amostras de DNA foram diluídas para concentração final de 25 ng/μL a fim de se utilizar 100 ng para metilação e 200 ng para hidroximetilação.

Os ensaios foram realizados segundo as recomendações do fabricante e segundo Biggar e Storey (2014). Primeiramente adicionou-se a solução para fixação das amostras ao fundo da placa. Em seguida, os poços foram incubados por 60 min em temperatura ambiente com o anticorpo de captura, que se liga ao DNA metilado. O anticorpo de detecção foi então adicionado seguido pela solução reveladora para produzir uma solução química colorimétrica (a solução fica azul em presença de quantidade significativa de DNA). Para interromper a reação enzimática foi adicionada a solução de parada; neste momento a solução dentro dos poços passa da cor azul para amarela. A absorbância foi lida em espectrofotômetro com leitor de microplacas (Bio-Rad® 3550) a 450 nm em um intervalo de 2 a 15 min.

6.7 Preparação da TSA

A tricostatina A (Sigma-Aldrich, T8552) foi utilizada na concentração de 50 nM nos meios de ativação e cultivo embrionário, totalizando 20 h ou 25 h. Para se chegar a esta concentração, um miligrama de TSA foi diluído em 6,62 mL de DMSO. Desta solução preparada retirou-se 1 mL, que foi adicionado a 9 mL de DMSO, obtendo-se, desta forma, a solução final para diluição no meio a ser utilizado na proporção de 1 µL da solução final de TSA para cada 1 mL de meio (ativação ou cultivo dos embriões).

6.8 Transferência nuclear de célula somática

6.8.1 Maturação *in vitro* dos ovócitos

Ovários bovinos foram obtidos de um abatedouro próximo ao CTZL e mantidos em solução fisiológica (0,9% de NaCl em água destilada, 1 µL/mL de solução de penicilina/estreptomicina) à 35°C durante o transporte até o laboratório. Complexos *cumulus*-ovócitos (CCO) foram aspirados de folículos de 3 a 8 mm de diâmetro na superfície do ovário, com uma agulha hipodérmica (diâmetro interno de 1,2 mm) e seringa de 10 mL e colocados dentro de tubos cônicos estéreis de 15 mL. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C, onde o aspirado folicular permaneceu por 10 a 15 minutos. O material folicular que sedimentou foi coletado e diluído em meio de lavagem (LAV) (TCM 199 Sais de Hank's com Hepes acrescido de 10% de SFB e 1 µL/mL de solução de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA), e então transferido para placa de Petri de 100 x 20 mm. Os CCO foram identificados e capturados sob estereomicroscópio (Nikon SMZ-10). Complexos com no mínimo duas camadas de células do *cumulus* compactas e não-atréticas, citoplasma homogêneo e

escuro foram selecionados e transferidos para as gotas do meio de maturação (MIV), composto de meio TCM 199 sais de Earl's, suplementado com 10% de SFB, 12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de LH, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de FSH, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de L-glutamina e 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de solução de penicilina/estreptomicina, cobertas com óleo mineral. Cerca de 30 a 35 CCO foram maturados em gotas de 200 μL de MIV, por 18 h em incubadora à 38,5°C e tensão de 5% CO_2 no ar.

6.8.2 Tratamentos experimentais

Foram realizadas as seguintes combinações experimentais: 1) Transferência nuclear (TN) com células do fluido amniótico sem TSA; 2) TN com células do fluido amniótico submetidas a 20 h em TSA; 3) TN com células do tecido adiposo sem TSA; 5) TN com células do tecido adiposo submetidas a 20 h em TSA. Para o controle foi realizada TN com fibroblastos da orelha sem TSA.

Nos tratamentos que receberam TSA, os embriões foram expostos a este HDACi durante a ativação por 4 h, e adicionalmente no meio de cultivo (CIV) por mais 16 h até completar o tempo total de 20 h (Figura 9).

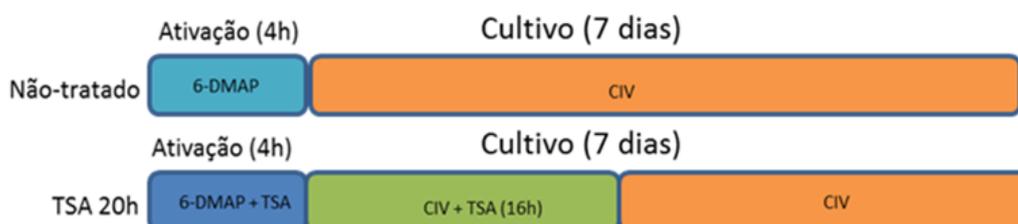


Figura 9. Esquema do procedimento de Transferência Nuclear e exposição dos embriões à tricostatina A (TSA) nos meios de ativação com 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) por 4 horas e adicionalmente por 16 horas no cultivo *in vitro* (CIV).

6.8.3 Transferência nuclear com os três tipos celulares

Foram realizadas de três a sete repetições de procedimentos de TN para cada tratamento utilizando-se apenas as células dos dois animais, da seguinte forma:

Desnudamento. Após as 18 h de maturação, os ovócitos foram desnudados pela ação de hialuronidase 0,2% por 5 minutos e repetidas pipetagens por mais 5 minutos. Foram selecionados os ovócitos que apresentaram o primeiro corpúsculo polar evidente. Os ovócitos selecionados foram incubados em citocalasina D (2,5 mg/mL) e Hoescht 33342 (1 mg/mL) diluídos em 1 mL de meio MIV, por oito minutos para marcação do núcleo dos ovócitos.

Preparação das células. As células de ambos os tipos celulares permaneceram em confluência por no mínimo dois dias antes do procedimento de TN, para sincronização nos estágios G0/G1 do ciclo celular. Os tipos celulares foram descolados por ação da tripsina e uma pequena quantidade de solução contendo as células foi adicionada às placas contendo os ovócitos já com o núcleo marcado. Essa placa foi levada ao micromanipulador para as etapas subsequentes.

Enucleação. O procedimento de transferência de núcleos foi realizado com auxílio de micromanipulador (dois sistemas de microinjeção hidráulicos e dois sistemas de micromanipulação eletrônicos (Narashige, Japan). Os ovócitos foram enucleados em meio de lavagem (LAV), com uma micropipeta de vidro com 20 µm de diâmetro, por aspiração do primeiro corpúsculo polar e da placa metafásica. A enucleação foi confirmada pela exposição do material à luz ultravioleta (UV) e observação do núcleo corado em azul fluorescente.

Microinjeção e reconstrução. Os ovócitos finalmente foram reconstruídos com os tipos celulares (células do tecido adiposo, do fluido amniótico e fibroblastos). A

reconstrução foi realizada depositando com a micropipeta, pelo mesmo orifício da enucleação, uma única célula no espaço perivitelino.

Eletrofusão. Os conjuntos ovócitos-células somáticas foram depositados em meio com manitol 0,3 M em uma câmara com dois eletrodos conectados ao eletrofusor (Cell fusion and activation system Voltain EP-1, Austrália). As estruturas reconstruídas foram manualmente alinhadas para que a superfície de contato entre a membrana do ovócito e a célula doadora estivesse paralela aos eletrodos. A fusão celular foi induzida por dois pulsos elétricos de 2,5 kV/cm por 65 μ s. Após o estímulo elétrico, os embriões reconstruídos foram lavados em meio LAV e levados para estufa por no mínimo 30 min. Após este período, a taxa da primeira eletrofusão foi avaliada. As estruturas degeneradas foram retiradas e as que não incorporaram a células doadoras ao citoplasma foram submetidas a outro ciclo de fusão, executado da mesma maneira que o primeiro. Após, no mínimo, 30 min, as estruturas foram verificadas e a taxa da segunda eletrofusão avaliada. Após 30 min a 1 h da fusão, as estruturas foram ativadas quimicamente.

Ativação química dos embriões. Os embriões reconstruídos do grupo não-tratado com TSA e os ovócitos do grupo partenogênético (controle do sistema de cultivo) foram ativados em meio contendo 5 μ M de ionomicina por 5 min e em seguida foram incubados em 1,9 mM de 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) por 4 h. Já os embriões tratados passaram pela ativação com 6-DMAP já acrescido de TSA por 4 h e adicionalmente foram colocados no cultivo por mais 16 h em TSA (total de 20 h de tratamento).

Cultivo. Finalmente, as estruturas foram cultivadas em meio Fluido de Oviduto Sintético (SOF) com 5% de SFB e com co-cultura de células do *cumulus* por até oito dias. A taxa de clivagem foi avaliada no segundo dia de cultivo (D2), e a taxa de

blastocisto no sétimo e oitavo dia de cultivo (D7 e D8). Blastocistos provenientes dos tratamentos TN com CTM-TA acrescido de TSA por 20, e sem TSA; e TN com CTM-FA sem TSA foram inovulados em fêmeas receptoras sincronizadas.

Um resumo dos procedimentos envolvidos na transferência nuclear está apresentado na Figura 10.

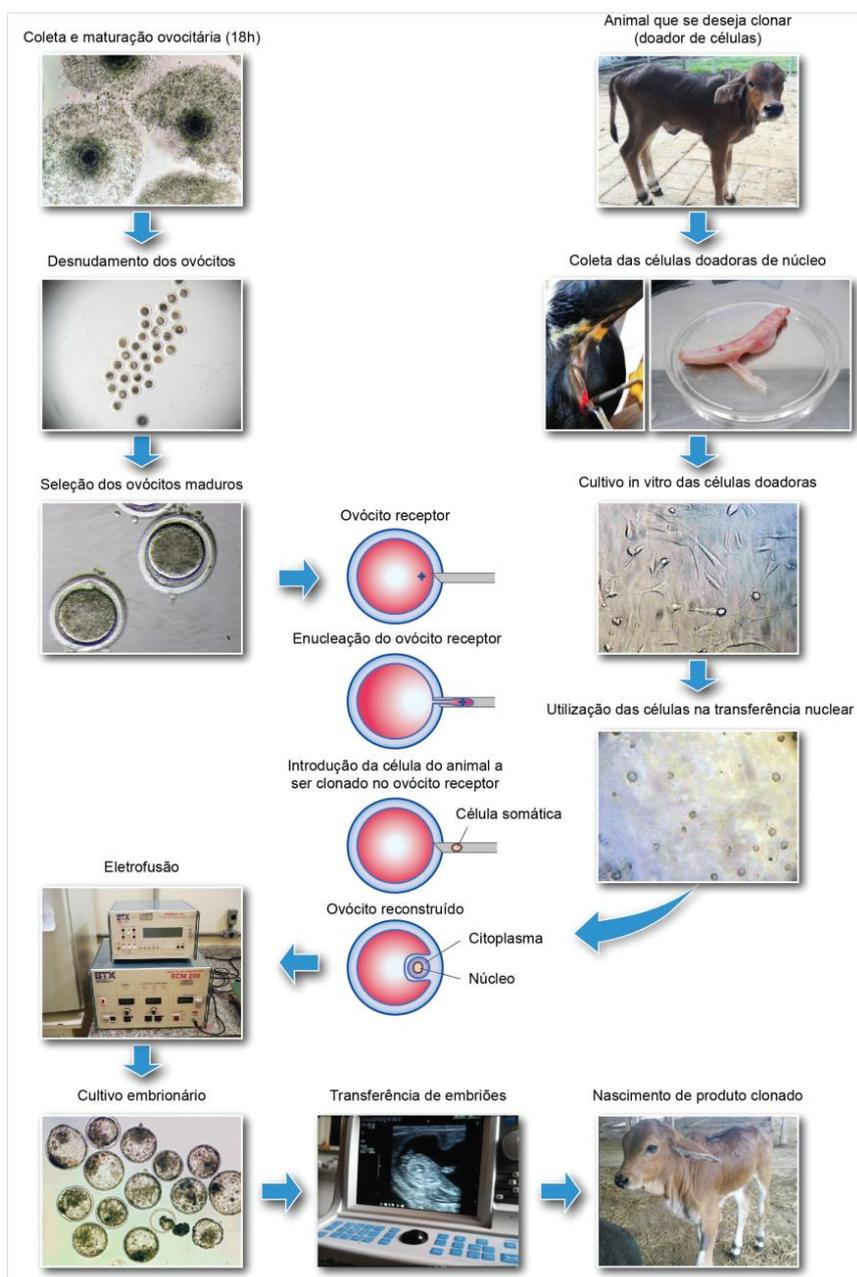


Figura 10. Sequência de eventos utilizados para produção de um clone bovino por Transferência de Núcleos.

6.9 Inovação dos embriões e monitoramento da gestação

As receptoras foram sincronizadas por meio de protocolo de transferência de embriões em tempo fixo (TETF). Os cios de vacas provenientes desse protocolo e também cios naturais foram observados no dia da TN. No sétimo dia seguinte do estro (estro = D0 = dia da TN), dependendo da qualidade embrionária e da quantidade de receptoras disponíveis, um ou dois blastocistos em LAV foram envasados em palheta de 0,25 mL e transferidos não cirurgicamente dentro do lúmen uterino ipsilateral ao corpo lúteo.

Usando ultrassonografia, o diagnóstico de gestação das fêmeas receptoras foi determinado no D35 da gestação e o desenvolvimento da gestação foi monitorado nos dias 45 e 60.

6.10 Congelamento de embriões destinados à expressão gênica

Após a verificação da taxa de desenvolvimento embrionário no sétimo dia de cultivo dos embriões de cada tratamento, parte deles foi inovulada em receptoras síncronas e outra parte foi congelada para avaliação de expressão gênica. Para isto, grupos de até cinco embriões de cada tratamento e manipulação foram transferidos para gotas de 40 μ L de PBS sem cálcio e sem magnésio e posteriormente lavados individualmente em gotas de 20 μ L do mesmo tipo de PBS. Cada embrião foi transferido para tubo cônico de 0,2 mL imerso em 2 μ L de PBS e coberto em 4 μ L de RNAlater (RNAlater Stabilization Solution – AM7020, Life Technologies). Todo o procedimento foi executado em gelo. Os tubos contendo os embriões foram

aconicionados à temperatura de 4°C *overnight* e, em seguida, armazenados à -20°C, onde permaneceram até o momento da avaliação.

6.11 Análise de expressão de KAT2A, HDAC1 e HDAC2

Para a análise de expressão gênica foram utilizados embriões provenientes dos tratamentos já citados e também embriões produzidos com fibroblastos adicionados a TSA por 20 h no meio de cultivo, do animal BOV2. O RNA total foi extraído de três pools de quatro embriões para cada tratamento utilizando o Kit PicoPure® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O total de RNA foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando o Kit First Strand cDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e tratadas com DNase PureLink (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas à 65 °C por 5 minutos, 50 °C por 50 minutos, e 85 °C por 5 minutos. As reações em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCRs) foram realizadas usando o kit Fast SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, utilizando o equivalente a 0,26 embrião do cDNA por reação. As condições de qPCR foram 95°C durante 5 minutos seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95°C durante 10 segundos e depois anelamento e extensão à 60°C durante 30 segundos.

Os genes quantificados pela qPCR estão envolvidos com a acetilação de histonas em ovócitos. Os genes referidos são: lisina acetiltransferase 2 A (KAT2A), histona desacetilase 1 (HDAC1), histona desacetilase 3 (HDAC3). As análises de real time RT-PCR foram realizadas utilizando 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). As sequências dos primers, tamanho do fragmento e temperatura de

anelamento estão listados na Tabela 3. As reações foram realizadas em triplicata para cada gene, com eficiência de amplificação entre 85 e 110%. O gene endógeno utilizado para as réplicas foi a β -actin (ACTB). A expressão relativa de cada gene foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência de Pfall.

Tabela 3. Informação dos *primers* específicos usados para amplificação dos fragmentos de genes para análise em qPCR tempo real.

| Genes | Sequência | Tamanho (pb) | Temperatura (°C) | GenBank |
|--------------|--|--------------|------------------|----------------|
| HDAC1 | F: ATC GGT TAG GTT GCT TCA ATC TG R: GTT GTA TGG AAG CTC ATT AGG GA | 188 | 60 | NM_001037444.2 |
| HDAC3 | F: GAA GAG GCC ATT AGT GAA GAG R: TCA GTC CTG TCG TAG GTT AG | 227 | 60 | NM_001206243.1 |
| KAT2A | F: TGG GAT TTG CTT CCG CAT GTT TCC R: TTG ACC TGC TCA TTG GAG GTG ACA | 81 | 60 | XM_003587447.4 |
| ACTB | F: GGC ACC CAG CAC AAT GAA GAT CAA R: ATC GTA CTC CTG CTT GCT GAT CCA | 126 | 60 | XM_010845770.1 |

6.12 Análise estatística

O delineamento experimental foi o Inteiramente Casualizado (DIC), com três a sete repetições para os procedimentos de transferência nuclear e três a cinco para a metilação global. As fontes de variação foram os três tipos células (CTM-AF, CMT-TA e FIB) e/ou presença ou ausência de TSA. As variáveis no formato de porcentagem foram transformadas para “raiz de arcoseno (x/100)”. A verificação estatística da significância dos tratamentos foi feita pela análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi usado para comparar as médias a 5% de probabilidade.

Todas as médias foram testadas para homogeneidade e normalidade pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. O modelo usado para analisar os dados foi o PROC GLM – Procedure GLM: *Generalized Linear Models*. Para avaliar a

hidroximetilação global uma análise descritiva foi realizada. Todas estas análises estatísticas foram realizadas usando o software estatístico SAS versão 9.1.2.

Para a análise de expressão gênica foi adicionado um tratamento, embriões reconstruídos com FIB cultivados com TSA por 20 h. Para comparação das médias foi realizado o teste de Tukey e o programa estatístico Prophet 5.0®.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais (CTM)

As células-tronco mesenquimais derivadas do fluido amniótico e do tecido adiposo revelaram resultados negativos para CD34 e CD45 nas análises de citometria de fluxo. Entretanto, resultados positivos para CD29, CD73, CD90 e CD105 foram obtidos em diferentes percentagens entre os grupos analisados (Figura 11).

Cerca de 80,4% e 81,3% das células do fluido amniótico foram positivas para CD29, 61,2% e 62,7% para CD73, 69,4% e 79,5% para CD90 e 49,7% e 51,6% para CD105, para as amostras do animal BOV1 e animal BOV2, respectivamente. Cerca de 61,6% e 61,2% das células do tecido adiposo foram positivas para CD29, 70,2% e 65,8% para CD73, 62,7% e 59,2% para CD90 e 60,2% e 60,2% para CD105, para amostras de BOV1 e BOV2, respectivamente.

Desta forma, comprova-se que as células isoladas tanto do fluido amniótico quanto do tecido adiposo tratavam-se de células tronco mesenquimais por expressarem o padrão de antígenos de superfície necessários para essa caracterização.

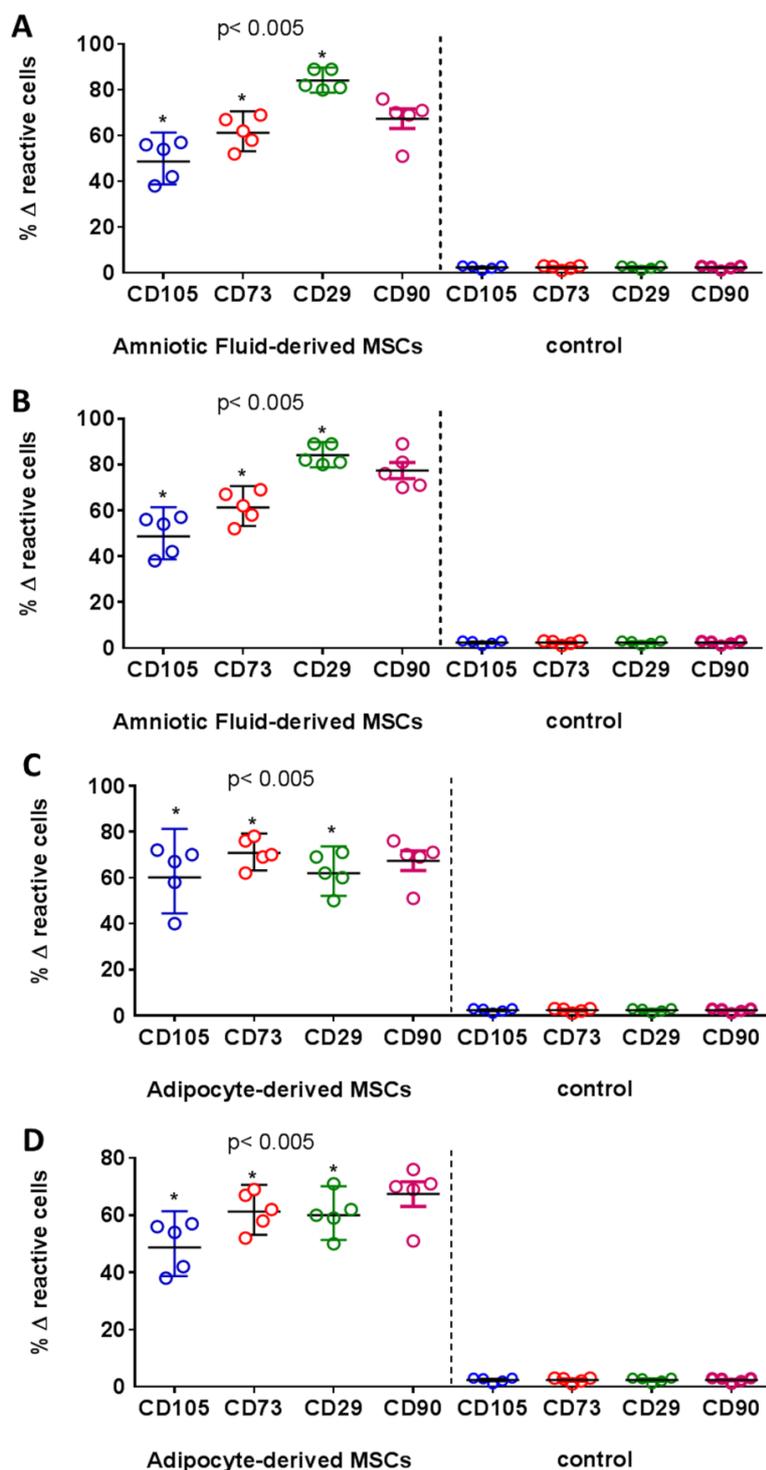


Figura 11. Porcentagem de cada marcador de superfície obtido por transformação dos resultados da citometria de fluxo e imunocoloração em média geométrica do logaritmo de cinco repetições com intervalo de confiança de 95%. *Médias estatisticamente diferentes ($p < 0,005$). Resultados para células do fluido amniótico de BOV1 (A) e BOV2 (B); resultados para células do tecido adiposo de BOV1 (C) e BOV2 (D). Controle realizado com células MDBK.

A pluripotência foi confirmada pela habilidade das CTM em expressar dez genes ligados à capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares, como demonstrado na Figura 12. Os genes LEP, FABP4 e PPARD estão ligados à diferenciação adipogênica; COL1A1 e SOX9 ligados à diferenciação condrogênica; GFAP e NES estão ligados à diferenciação neurogênica; e, por fim, OMD, POST e OSTF1 relacionados à diferenciação osteogênica.

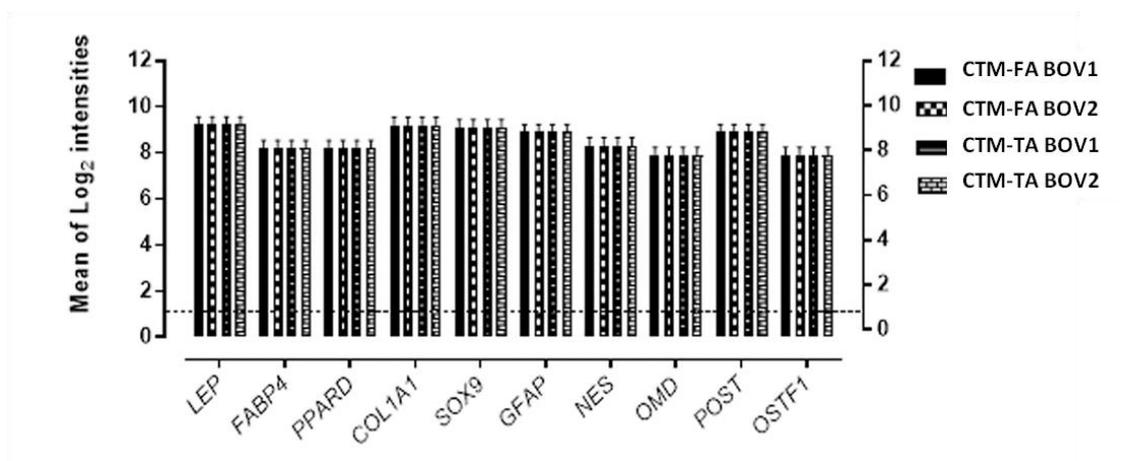


Figura 12. Análise de transcriptoma de marcadores de pluripotência de células-tronco mesenquimais derivadas do fluido amniótico (CTM-FA) e tecido adiposo (CTM-TA). A expressão gênica relativa está representada como média + desvio padrão obtida de quatro experimentos diferentes. A linha pontilhada está posicionada na média dos marcadores conhecidamente negativos de célula-tronco mesenquimal. Genes com valores de expressão relativa acima dessa linha foram considerados *upregulated* e foram analisados em comparação ao controle compreendendo a população de linfócitos T bovinos.

Além da expressão gênica, a pluripotência da CTM-FA e CTM-TA também foi confirmada pela sua diferenciação em três tipos celulares distintos. A diferenciação osteogênica foi detectada pela calcificação da matriz mostrada pela coloração de Alizarin Red. Após a indução, a diferenciação adipogênica foi visualizada com um grande número de pequenos vacúolos lipídicos que coraram positivamente usando a

solução de Oil Red. A diferenciação condrogênica foi confirmada pela observação dos glicosaminoglicanos (Figura 13).

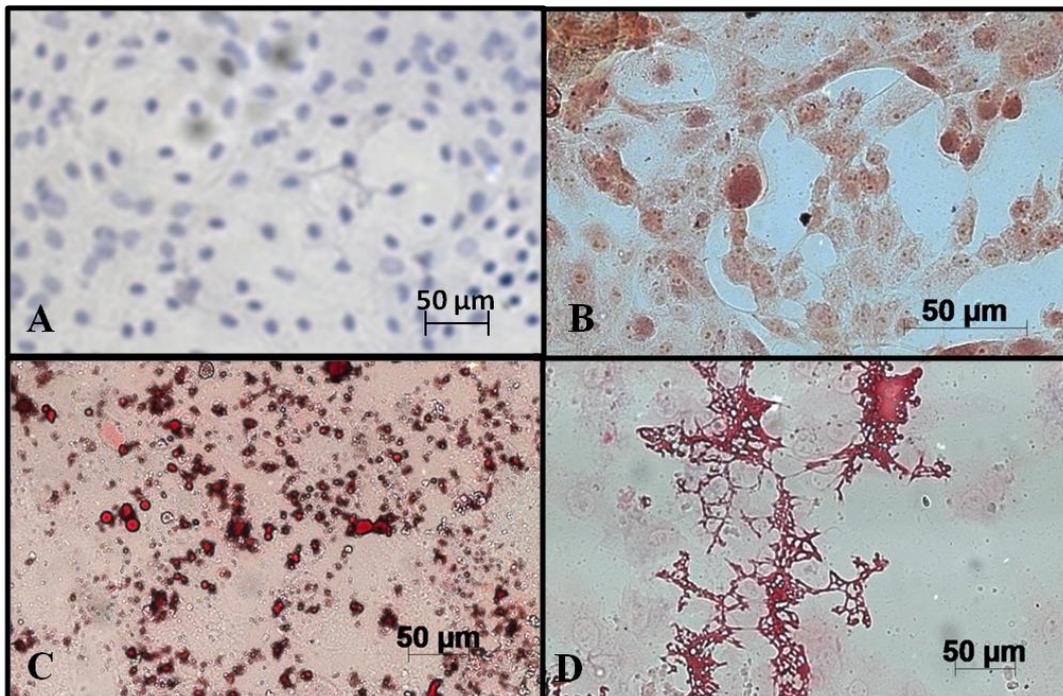


Figura 13. Diferenciação das células-tronco mesenquimais em linhagens celulares. Para cada protocolo de diferenciação, células indiferenciadas foram mantidas para o controle (A). B) Diferenciação em condrócitos confirmada pela coloração de Safranina O, revelando glicosaminoglicanos; C) Diferenciação em adipócitos confirmada pela coloração de *Oil Red*, destacando os depósitos lipídicos em vermelho; D) Diferenciação em osteócitos com depósitos de cálcio confirmada pela coloração de *Alizarin Red*.

7.2 Extração de DNA genômico

O gel de eletroforese resultante das extrações do DNA das CTM-FA, CTM-TA e fibroblastos (FIB) por meio do método de *salting out* está na Figura 14. Pode-se observar uma diferença na quantificação de DNA por observação e por meio do NanoDrop®. Isto se deve ao fato de que o espectrofotômetro conta algumas moléculas que não se tratam de DNA. Para todas as amostras foram obtidas quantidades

suficientes de DNA para realização das avaliações posteriores, comprovando a eficácia do método de salting out, o que dispensou gastos extras com a aquisição de um kit de extração de DNA.

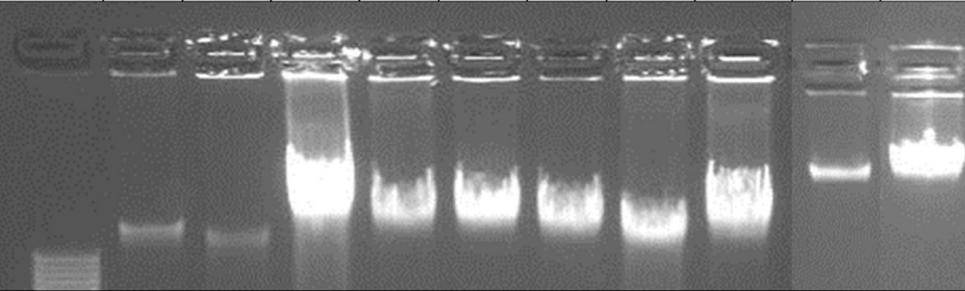
| Amostras | M 1 kb | CTM-TA P6* | CTM-TA P6* | CTM-TA P6** | CTM-TA P6** | FIB P6* | FIB P6* | FIB P6** | FIB P6** | CTM-FA P7* | CTM-FA P6** |
|--------------------------------|--|---------------|---------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------------|
| |  | | | | | | | | | | |
| Quantidade de DNA ¹ | | 40 ng/μL | 33 ng/μL | 500 ng/μL | 250 ng/μL | 270 ng/μL | 350 ng/μL | 200 ng/μL | 270 ng/μL | 83 ng/μL | 833 ng/μL |
| Quantidade de DNA ² | | 325 ng/μL | 767 ng/μL | 1554 ng/μL | 537 ng/μL | 727 ng/μL | 539 ng/μL | 565 ng/μL | 728 ng/μL | 606 ng/μL | 660 ng/μL |

Figura 14. Gel de eletroforese (0,8% de agarose) resultante da extração do DNA das células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA), células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) e fibroblastos (FIB). M: marcador molecular de 1 kb. *Animal BOV1; **Animal BOV2. ¹Quantidade de DNA mensurada por observação do gel; ²Quantidade de DNA mensurada pelo NanoDrop®. P6: células utilizadas na sexta passagem; P7: células utilizadas na sétima passagem.

A partir do DNA genômico extraído por *salting out* foram realizadas as avaliações de metilação e hidroximetilação global das amostras com um método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Para a avaliação de metilação foram utilizados 100 ng de DNA e para a hidroximetilação foram utilizados 200 ng de DNA, sendo a quantificação realizada por observação do gel a utilizada para o cálculo da quantidade de amostra dos tipos celulares.

7.3 Metilação e hidroximetilação global dos tipos celulares

As células-tronco mesenquimais do fluido amniótico e do tecido adiposo do animal BOV1 apresentaram percentagem significativamente maior para metilação global ($1,59 \pm 0,33\%$ e $2,09 \pm 0,26\%$, respectivamente) do que os fibroblastos ($0,43 \pm 0,12\%$) (Figura 15). O que sugere um melhor desempenho na clonagem bovina dos fibroblastos da orelha, por se apresentarem menos metilados.

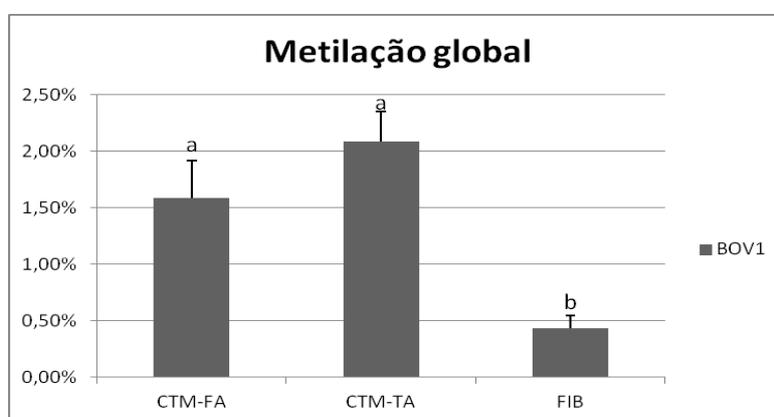


Figura 15. Porcentagem de metilação global do DNA das células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA), células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) e fibroblastos (FIB) para o animal BOV1. ^{a,b}Letras diferentes nas barras representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Entretanto, nas células do animal BOV2 o oposto aconteceu com as CTMs apresentando taxas de metilação similares entre as duas fontes de obtenção ($1,04 \pm 0,40\%$ e $1,29 \pm 0,18\%$ para CTM-FA e CTM-TA, respectivamente), sendo que as CTM-FA foram significativamente menos metiladas do que FIB ($1,59 \pm 0,25\%$) (Figura 16). Este resultado sugere que as CTM-FA poderiam apresentar um melhor desempenho na clonagem, quando comparadas aos fibroblastos.

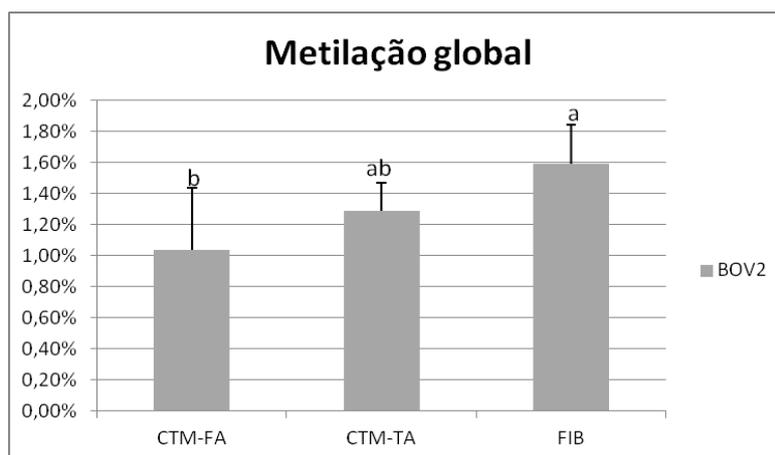


Figura 16. Porcentagem de metilação global do DNA das células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA), células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) e fibroblastos (FIB) para o animal BOV2. ^{a,b}Letras diferentes nas barras representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Neste experimento, a hidroximetilação global entre as células analisadas apresentou o mesmo padrão para ambos os animais analisados (Figuras 17 e 18). Tanto para o animal BOV1 quanto para o BOV2 as células provenientes do fluido amniótico foram as menos hidroximetiladas (0,008 e 0,002%, respectivamente), seguidas dos fibroblastos (0,013 e 0,009%, respectivamente) e, finalmente, as CTM-TA apresentaram a maior porcentagem de 5-hmc no DNA (0,072 e 0,03%, respectivamente).

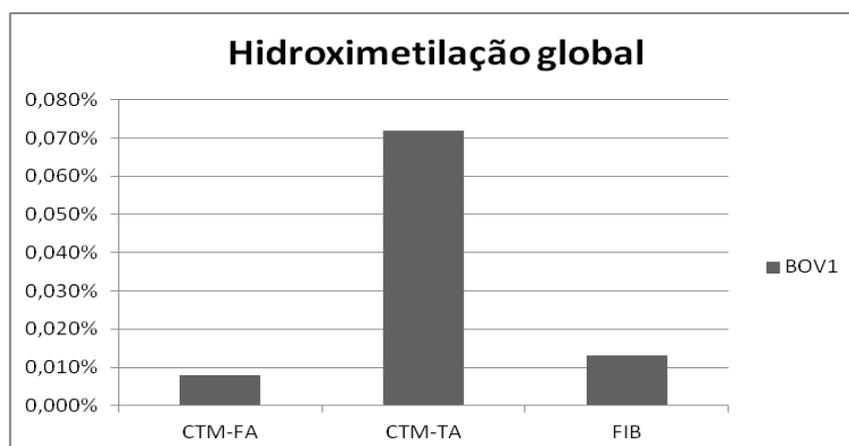


Figura 17. Porcentagem de hidroximetilação global do DNA das células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA), células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) e fibroblastos (FIB) para o animal BOV1.

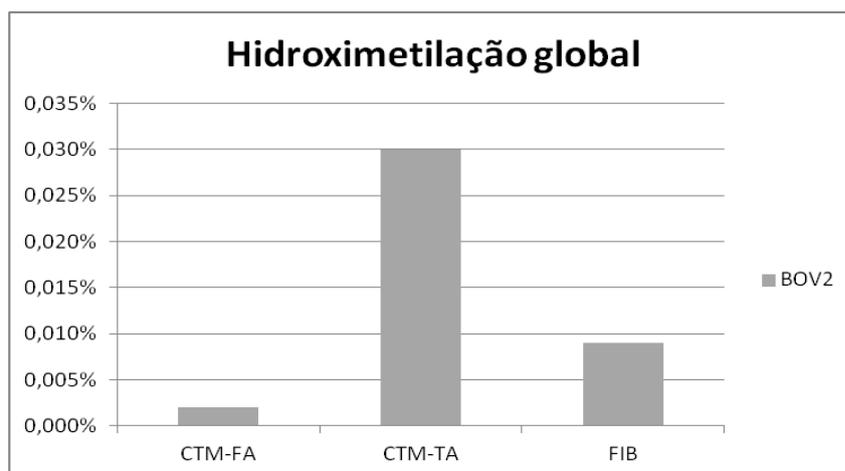


Figura 18. Porcentagem de hidroximetilação global do DNA das células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA), células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) e fibroblastos (FIB) para o animal BOV2.

7.4 Desenvolvimento embrionário após Transferência Nuclear

Para testar a competência na clonagem bovina das CTM-FA, CTM-TA e dos FIB associadas à TSA, a transferência nuclear foi realizada usando micromanipuladores com células de duas diferentes linhagens celulares/animais (BOV1 e BOV2).

Os resultados referentes às quantidades de estruturas manipuladas (estruturas reconstruídas, fusionadas, degeneradas) e embriões produzidos em D2, D7 e D8, utilizando cada tipo celular dos animais BOV1 e BOV2 encontram-se nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Ao todo foram produzidos 134 blastocistos TNCS a partir de 397 estruturas submetidas ao cultivo *in vitro* após a fusão, gerando uma taxa de eficiência global da técnica de 33,75%, para o animal BOV1. Já para o animal BOV2 essa taxa foi de 28,37%, com produção de 124 embriões, considerando todos os tipos celulares.

Tabela 4. Quantidade de estruturas manipuladas para produção de embriões bovinos clonados a partir de células-tronco mesenquimais provenientes do fluido amniótico (CTM-FA) e do tecido adiposo (CTM-TA), e fibroblastos da orelha (FIB) do bovino da linhagem 1 (BOV1) na presença de tricostatina A por 20 horas (h) em cultivo ou sem a tricostatina A (ST).

| Tratamento | Ovócitos selecionados | Estruturas reconstruídas | Estruturas degeneradas | Estruturas fusionadas | Estruturas cultivadas | Estruturas clivadas | Blasto¹ em D7² | Blasto em D8³ | Blasto total |
|-------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|---|---------------------------------|---------------------|
| CTM-FA-20h | 751 | 221 | 110 | 68 | 57 | 53 | 22 | 0 | 22 |
| CTM-FA-ST | 440 | 112 | 33 | 40 | 38 | 37 | 19 | 1 | 20 |
| CTM-TA-20h | 1109 | 307 | 120 | 152 | 118 | 102 | 36 | 5 | 41 |
| CTM-TA-ST | 890 | 275 | 116 | 98 | 87 | 71 | 27 | 0 | 27 |
| FIB-ST | 925 | 232 | 128 | 99 | 97 | 75 | 24 | 0 | 24 |

¹ Blastocisto

² Sétimo dia de cultivo

³ Oitavo dia de cultivo

Tabela 5. Quantidade de estruturas manipuladas para produção de embriões bovinos clonados a partir de células-tronco mesenquimais provenientes do fluido amniótico (CTM-FA) e do tecido adiposo (CTM-TA), e fibroblastos da orelha (FIB) do bovino da linhagem 2 (BOV2) na presença de tricostatina A por 20 horas (h) em cultivo ou sem a tricostatina A (ST).

| Tratamento | Ovócitos selecionados | Estruturas reconstruídas | Estruturas degeneradas | Estruturas fusionadas | Estruturas cultivadas | Estruturas clivadas | Blasto¹ em D7² | Blasto em D8³ | Blasto total |
|-------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|---|---------------------------------|---------------------|
| CTM-FA-20h | 536 | 163 | 82 | 58 | 55 | 49 | 24 | 1 | 25 |
| CTM-FA-ST | 796 | 220 | 67 | 85 | 82 | 68 | 22 | 2 | 24 |
| CTM-TA-20h | 563 | 151 | 52 | 73 | 51 | 42 | 19 | 0 | 19 |
| CTM-TA-ST | 892 | 259 | 121 | 111 | 99 | 80 | 24 | 2 | 25 |
| FIB-ST | 1223 | 396 | 154 | 187 | 150 | 122 | 30 | 1 | 31 |

¹ Blastocisto

² Sétimo dia de cultivo

³ Oitavo dia de cultivo

As taxas de maturação, eletrofusão, clivagem e produção de blastocistos (em D7, D8 e total) em relação ao número de estruturas fusionadas ou clivadas, expressos em porcentagem, encontram-se nas Tabelas 6 e 7.

Na Tabela 6, que sumariza as taxas obtidas da TN com as células do BOV1, pode-se notar que a taxa de fusão foi superior no tratamento com CTM-TA-20h quando comparado a CTM-FA-20h e similar a todos os outros. Em adição, o tratamento CTM-FA sem TSA mostrou-se superior a CTM-TA também sem TSA no cultivo, para a taxa de clivagem. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada para a produção embrionária no sétimo e oitavo dias de cultivo.

Os resultados obtidos no experimento com BOV2 estão disponíveis na Tabela 7. As CTM-FA-20h produziram $44,92 \pm 8,88\%$ de blastocistos clonados. Esse resultado foi superior a outros tratamentos sem TSA na produção de blastocistos no sétimo dia de cultivo.

Quando a produção embrionária foi avaliada até o oitavo dia de cultivo, CTM-FA-20h permaneceu superior a CTM-TA e FIB sem TSA, mas também foi similar aos tratamentos CTM-FA sem TSA e CTM-TA-20h. Ambas as taxas demonstram a maior eficiência na produção embrionária quando CTM-FA foram usadas sem ou com TSA ou quando CTM-TA são usadas em associação com TSA.

A Figura 17 mostra que não houve diferenças morfológicas aparentes entre os embriões, independente do tipo celular e uso da TSA, ressaltando a importância de uma avaliação mais profunda, como análise de expressão gênica, para detalhar os efeitos do uso da TSA no cultivo de embriões clonados.

Tabela 6. Taxas de fusão, clivagem e blastocistos bovinos obtidos por transferência nuclear utilizando células-tronco mesenquimais provenientes do fluido amniótico (CTM-FA) e do tecido adiposo (CTM-TA), e fibroblastos da orelha (FIB) do bovino da linhagem 1 (BOV1) na presença de tricostatina A (TSA) por 20 horas (h) em cultivo ou sem a TSA (ST).

| BOV1 Tratamento | Fusão | Clivagem | Blastocisto no dia 7 | Blastocisto total |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| CTM-FA-20h | 30.80 ± 5.27 ^b | 92.66 ± 5.24 ^{ab} | 38.72 ± 10.02 | 38.72 ± 10.02 |
| CTM-FA-ST | 35.94 ± 2.21 ^{ab} | 96.88 ± 4.42 ^a | 48.30 ± 15.27 | 51.42 ± 10.85 |
| CTM-TA-20h | 49.54 ± 4.05 ^a | 87.25 ± 8.41 ^{ab} | 32.14 ± 17.09 | 36.21 ± 14.11 |
| CTM-TA-ST | 36.11 ± 9.25 ^{ab} | 81.60 ± 4.33 ^b | 32.42 ± 9.24 | 32.42 ± 9.24 |
| FIB-ST | 43.80 ± 6.56 ^{ab} | 84.98 ± 8.63 ^{ab} | 28.24 ± 16.17 | 28.24 ± 16.17 |

Letras diferentes nas colunas representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 7. Taxas de fusão, clivagem e blastocistos bovinos obtidos por transferência nuclear utilizando células-tronco mesenquimais provenientes do fluido amniótico (CTM-FA) e do tecido adiposo (CTM-TA), e fibroblastos da orelha (FIB) do bovino da linhagem 2 (BOV2) na presença de tricostatina A (TSA) por 20 horas (h) em cultivo ou sem a TSA (ST).

| BOV2 Tratamento | Fusão | Clivagem | Blastocisto no dia 7 | Blastocisto total |
|----------------------------|---------------|-----------------|---------------------------------|------------------------------|
| CTM-FA-20h | 35.95 ± 15.69 | 89.79 ± 9.13 | 44.92 ± 8.88 ^a | 46.39 ± 8.53 ^a |
| CTM-FA-ST | 39.69 ± 14.83 | 82.57 ± 7.21 | 26.15 ± 7.06 ^{bc} | 28.32 ± 7.52 ^{ab} |
| CTM-TA-20h | 46.12 ± 9.38 | 79.63 ± 11.56 | 37.96 ± 15.80 ^{ab} | 37.96 ± 15.80 ^{ab} |
| CTM-TA-ST | 43.66 ± 17.37 | 79.21 ± 7.76 | 21.67 ± 9.57 ^{bc} | 22.54 ± 11.13 ^b |
| FIB-ST | 47.74 ± 17.86 | 80.16 ± 9.59 | 19.47 ± 3.74 ^c | 20.36 ± 5.58 ^b |

Letras diferentes nas colunas representam diferença estatística ($p < 0,05$).

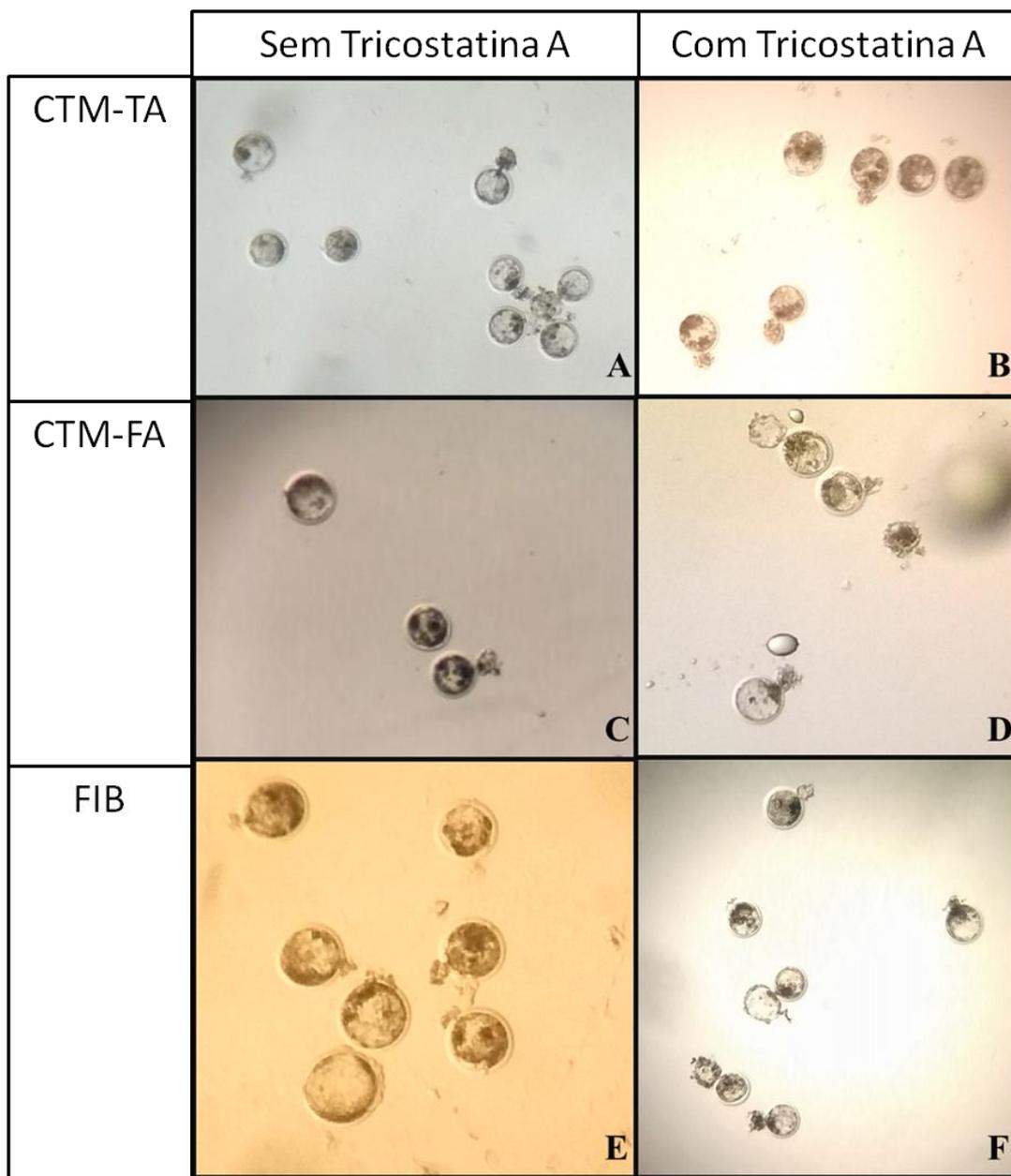


Figura 19. Embriões com sete dias de desenvolvimento, clonados a partir de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA), células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA) e fibroblastos da pele (FIB) sem uso de Tricostatina A no meio de cultivo (A, C e E), e com Tricostatina A por 20 horas no cultivo (B, D e F).

7.5 Desenvolvimento dos embriões após inovulação

Os embriões produzidos em meios com adição de TSA por 20 h provenientes de CTA resultaram em duas gestações de animais clonados (Tabela 8). Entretanto, essas gestações foram perdidas até o 60º dia de gestação.

Ao analisar as gestações por meio de ultrassonografia, observou-se que aos 35 dias elas aparentavam ser normais, no entanto, a partir do 45º dia de desenvolvimento, apenas observou-se a vesícula sem o embrião ou um embrião sem batimento cardíaco, ambas as situações sugestivas de aborto, que foi confirmado aos 60 dias. Essas observações nos remetem ao efeito tóxico que a TSA possui e que pode ser prejudicial se a droga for utilizada em doses excessivas, entretanto, como poucos embriões foram transferidos, uma avaliação mais detalhada e completa dos efeitos da TSA no desenvolvimento embrionário pós-implantacional deve ser realizada.

Tabela 8. Prenhez resultantes da transferência de embriões bovinos clonados a partir de células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA) e do tecido adiposo (CTM-TA), e fibroblastos da orelha (FIB) do bovino da linhagem 1 (BOV1) na presença de tricostatina A (TSA) por 20 horas (h) em cultivo ou sem a TSA (ST).

| Tratamento | Nº de embriões reconstruídos transferidos | Nº de receptoras | 35 dias de gestação (Nº e %) | 45 dias de gestação | 60 dias de gestação | Nascido vivo |
|--------------|---|------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|--------------|
| CTM-TA-20h | 6 | 5 | 2 (33,3%) | 1 | 0 | 0 |
| CTM-TA-ST | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CTM-FA-ST | 6 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FIB-ST | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Total</i> | 31 | 25 | | | | |

Adicionalmente, uma gestação foi obtida de embrião produzido de fibroblastos sem o tratamento com TSA. A gestação prosseguiu normal até o momento do parto. Por se tratar de gestação de animal clonado optou-se pelo nascimento assistido por cesariana. A bezerra nasceu saudável aos 294 dias de gestação apresentando como única alteração característica de animais clonados o cordão umbilical muito espessado, passando por cirurgia para correção. Atualmente a bezerra encontra-se com quatro meses de idade e saudável (Figura 18).



Figura 20. A) Bovinos da raça Gir utilizados e produzidos durante o experimento: fêmea bovina doadora de células (seta branca) e clone produzido a partir dessas células (seta preta). B) Animal doador de material genético para a clonagem por Transferência Nuclear, BOV1 (Calidora), aos três anos de idade; C) Animal (Acácia) proveniente de clonagem com fibroblastos da orelha do BOV1 aos quatro meses de idade.

7.6 Análises de expressão gênica dos embriões clonados

Uma outra avaliação adotada nesse estudo para verificar o efeito da TSA na clonagem bovina foi a análise de expressão de genes ligados a epigenética. Por meio do real time PCR quantitativo foi estabelecido o perfil de RNAm para uma histona desacetilase (HAT), a KAT2A, e duas HDACs, que podem estar envolvidas na reprogramação do núcleo e na ativação ou silenciamento da cromatina. O RNAm da β -actin (ACTB) um constituinte do nucleossomo, também foi verificado e empregado para padronizar os resultados.

Para o gene HDAC1 não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos.

Para HDAC3 foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com CTM-FA com e sem TSA ($p=0,0624$), sendo que o tratamento com TSA foi efetivo em reduzir a expressão dessa histona-desacetilase (Figura 19).

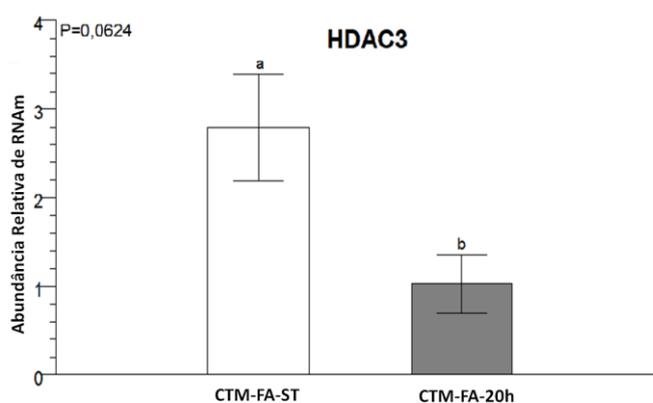


Figura 21. Abundância relativa de RNAm do gene HDAC3 em blastocistos bovinos clonados a partir de células-tronco do fluido amniótico tratados por 20 h no meio de cultivo com tricostatina A (CTM-FA-20h) ou não tratados (CTM-FA-ST). Letras diferentes nas colunas representam diferença significativa ($P=0,0624$).

Ainda para HDAC3, quando se comparou os três tipos celulares, no tratamento sem TSA, os embriões reconstruídos com fibroblastos apresentaram menor nível de expressão desse gene, estatisticamente semelhante aos reconstruídos com células do tecido adiposo (Figura 19). Quando a droga inibidora de HDAC foi utilizada no cultivo dos embriões, essa diferença desapareceu e os níveis de expressão de HDAC3 foram semelhantes entre os tratamentos.

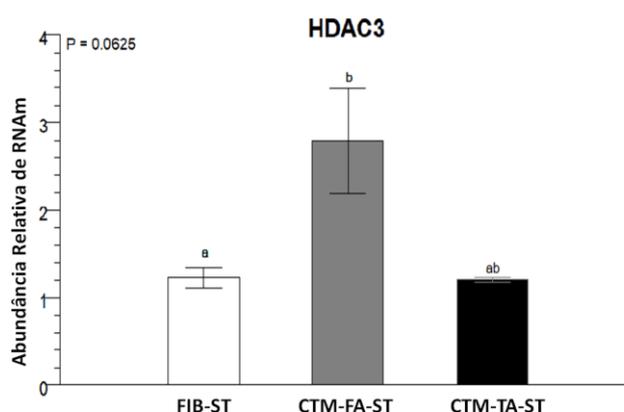


Figura 22. Abundância relativa de RNAm do gene HDAC3 em blastocistos bovinos clonados a partir de fibroblastos da orelha (FIB-ST), células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA-ST) e células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA-ST) não tratados com tricostatina A. Letras diferentes nas colunas representam diferença significativa ($P=0,0625$).

Para o gene KAT2A somente foi observada diferença estatística quando se comparou os três tipos celulares, no tratamento com a TSA, os embriões reconstruídos com fibroblastos apresentaram menor nível de expressão desse gene comparativamente aos reconstruídos com células do fluido amniótico e do tecido adiposo, que foram semelhantes entre si (Figura 21).

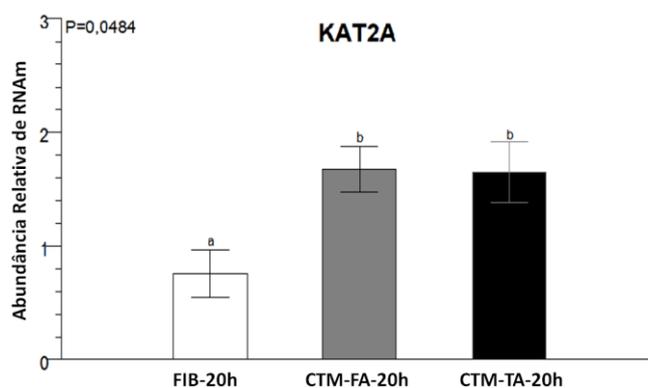


Figura 23. Abundância relativa de RNAm do gene KAT2A em blastocistos bovinos clonados tratados com tricostatina A por 20 h no meio de cultivo utilizando fibroblastos da orelha (FIB-20h), células-tronco mesenquimais do fluido amniótico (CTM-FA-20h) e células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA-20h). Letras diferentes nas colunas representam diferença significativa ($P=0,0484$).

8. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi examinado se o uso de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e do fluido amniótico como fonte de células doadoras de núcleos, em associação com o tratamento dos embriões com Tricostatina A, pode melhorar o desenvolvimento de embriões bovinos clonados por transferência de núcleos. Os resultados observados indicam uma melhora significativa na produção de embriões bovinos clonados quando foi feita a associação da TSA, um potente inibidor de HDAC, e as células-tronco mesenquimais derivadas de duas fontes distintas, quando essas células-tronco se apresentavam menos metiladas e mais hidroximetiladas do que os fibroblastos da orelha, o que aconteceu no animal BOV2.

Muitos estudos em diferentes espécies animais têm descrito o comportamento dos fibroblastos como doadores de núcleo associado com alguma droga que atue no âmbito epigenético, tais como em suínos (Whitworth et al., 2015), camundongos (Kishigami et al., 2006; Kang and Roh et al., 2011) e bovinos (Enright et al., 2003; Akagi et al., 2011; Lee et al., 2011; Wang et al., 2011; Oh et al., 2012; Sawai et al., 2012). O atual trabalho descreve, pela primeira vez, o uso de CTMs em conjunto com 50 nM de TSA por 20 h, um potente inibidor de HDAC na produção de embriões bovinos clonados. A concentração e o tempo de exposição à TSA foram usados baseados em diferentes resultados na literatura em algumas espécies (Beebe et al., 2009; Akagi et al., 2011; Lee et al., 2011; Sawai et al., 2012; Cao et al., 2017).

Akagi et al. (2011) verificaram que houve diferenças na produção embrionária quando a TSA foi utilizada até mesmo entre linhagens do mesmo tipo celular. Neste caso foi verificado que o uso de uma linhagem de fibroblastos não melhorou o desenvolvimento de blastocistos quando usada em associação com TSA, comparado

com duas outras linhagens, onde o efeito foi positivo. Da mesma forma, Beyhan et al. e Poehland et al. descreveram, em 2007, o efeito da linhagem nas taxas de embriões, entretanto sem o uso da TSA. Estes trabalhos citados ressaltaram os efeitos individuais no desempenho na transferência nuclear, contudo nenhum deles fornece uma explicação para tal fato. Os achados deste trabalho suportam a hipótese de que essas diferenças na produção embrionária entre animais sejam devido ao *status* de metilação global dos tipos celulares e que isso talvez seja um fator determinante relacionado ao sucesso da TNCS.

Os resultados indicam a ocorrência de influência individual na metilação global dos diferentes tipos celulares e que essas diferenças no *status* de metilação podem afetar a produção embrionária na clonagem, já que diferentes resultados puderam ser observados nas linhagens celulares de dois bovinos diferentes (BOV1 e BOV2). A melhora na eficiência de produção de blastocistos no sétimo dia de cultivo associada com o uso da TSA e CTMs foi observada no BOV2, que apresentou as CTMs de fluido amniótico e do tecido adiposo menos metiladas e mais hidroximetiladas. Entretanto, quando a metilação foi maior nos FIB comparado às CTMs, que foi encontrado no animal BOV1, o uso da TSA não foi suficiente para aumentar a produção embrionária.

Por outro lado, ao analisar os dados obtidos do animal BOV1 observou-se que o uso da TSA não resultou em uma diferença na produção de embriões, similarmente ao que ocorreu na clonagem na espécie suína, utilizando outro HDACi, o SAHA (Whitworth et al., 2015). Entretanto, o uso da droga aumentou a acetilação das histonas a níveis similares àqueles observados nos embriões produzidos por fertilização *in vitro*, que sugere que, embora não haja alteração na eficiência da técnica, os embriões clonados foram capazes de produzir descendentes saudáveis.

Neste estudo, algumas gestações foram obtidas com o uso da TSA com as células do animal BOV1, porém foram interrompidas em diferentes períodos de desenvolvimento. Segundo Sawai e colaboradores (2012), o uso da TSA na concentração de 50 nM não foi efetivo em superar os abortos que são uma característica comum dos fetos produzidos por TNCS, concluindo que o tratamento com TSA não tem efeito no completo desenvolvimento dos embriões clonados após a transferência. Devido às poucas transferências de embriões, os resultados obtidos neste estudo não são suficientes para confirmar que a TSA é uma droga com efeito tóxico, apesar de que nenhum nascimento tenha ocorrido.

O único nascimento obtido deste animal foi o proveniente de reconstruções embrionárias com os fibroblastos da orelha que, neste animal, foram o tipo celular menos metilado. A taxa de produção embrionária obtida com os fibroblastos menos metilados foram estatisticamente semelhantes às taxas de todos os outros tratamentos, onde nem a TSA nem o uso de células-tronco foi suficiente para aumentar a produção de blastocistos, sugerindo que a metilação da célula doadora possa ter sido um fator determinante para o sucesso da TNCS neste caso.

Esses resultados são corroborados por aqueles obtidos em TNCS de búfalos, onde o uso da TSA (Selokar et al., 2015) e ácido valpróico – outro HDACi – (Selokar et al., 2017) não foi efetivo em melhorar a competência de desenvolvimento *in vitro* dos embriões produzidos por transferência nuclear ou clonagem por *hand made*, respectivamente.

Da mesma forma, Secher et al. (2017) trabalhando com suínos observaram mais problemas de desenvolvimento quando da utilização de células embrionárias germinativas (EGC) do que com fibroblasto. Desta forma, os autores não relatam

nenhuma vantagem de se utilizar ECG sobre fibroblastos, a não ser o tempo de vida *in vitro* melhorado das ECG.

A melhora na taxa de produção de blastocistos associado com o uso de 50 nM de TSA por 20 h no meio de cultivo embrionário foi reportado em nosso experimento quando a TSA foi usada em associação com CTM-FA provenientes do animal BOV2, resultando em 44,92% de produção de blastocistos. Similarmente Lee et al. (2011) observaram a produção de 43,5% de blastocistos, quando fibroblastos foram utilizados na TN em associação com TSA. No presente estudo, o uso de fibroblastos sem a exposição do embrião a TSA, proporcionou a produção de 19,47% de blastocistos. Da mesma forma que Lee et al. (2011) encontraram 21,7% de blastocistos e Akagi et al. (2011) obtiveram 16% usando os fibroblastos sem nenhuma exposição às drogas. Estes resultados demonstram o efeito benéfico da TSA na formação de embriões TNCS quando a droga foi associada com células menos metiladas, como as CTM-FA para este animal. Além disso, a alta eficiência da produção de blastocisto *in vitro* na clonagem bovina foi atingida com o tratamento com 50 nM de TSA por 14 h (Sawai et al., 2012) e por 24 h em suínos (Beebe et al., 2009; Cao et al., 2017).

Quando se testou o uso de 50 nM de TSA no cultivo embrionário com FIB como doador de núcleo, Akagi et al. (2011) atingiram 26% de blastocistos, similar ao atingido com o BOV2 neste experimento sem o uso da TSA mas com CTM-FA (26,15%), demonstrando a eficiência do uso de células menos metiladas na TNCS.

O efeito benéfico da TSA nos embriões reconstruídos com as células do animal BOV2 ficou evidente também na expressão dos genes ligados à epigenética mensurados nos embriões clonados. A expressão de KAT2A nos blastocistos clonados neste experimento não diferiu entre os grupos tratados com TSA e os grupos não tratados, da mesma forma que no experimento de Lee et al. (2011). Somente dentre os embriões

tratados com TSA por 20 h foi evidenciada uma maior expressão de KAT2A quando foram utilizadas células-tronco mesenquimais como doadoras de núcleo. Possivelmente a TSA tenha representado um efeito benéfico na produção dos embriões, pois, quando ela não foi utilizada a expressão de KAT2A nos embriões não diferiu entre os tratamentos com os diferentes tipos celulares.

Neste experimento, quando não foi utilizada a TSA no cultivo dos embriões, foi observada uma maior expressão da HDAC3 nos embriões reconstruídos com CTM-FA, o tipo celular menos metilado, entretanto, quando adicionou-se a droga inibidora de HDAC ao cultivo desses embriões reconstruídos com CTM-FA, a droga teve ação suficiente para reduzir a expressão da HDAC3 comparado aos embriões que não receberam o tratamento com TSA.

Somando-se a isso, a maior taxa embrionária para o BOV2 foi atingida quando se utilizou justamente CTM-FA e TSA por 20 h no meio de cultivo, o que corrobora o que Lee e colaboradores (2011) já haviam afirmado, sendo provável que a regulação da acetilação das histonas afete a taxa de sucesso na clonagem animal.

Recentemente Qiu et al. (2017), usando células do *cumulus* como doadoras de núcleo, reportaram que o tratamento com 5 nM de TSA por 10 h em embriões de camundongo promoveu a melhora da eficiência do desenvolvimento embrionário, sugerindo uma otimização de concentração e tempo de tratamento com a droga. Em adição, os mesmos autores testaram em camundongos uma nova HDACi, a PXD101, onde reportaram que esta droga efetivamente melhorou a capacidade de desenvolvimento *in vitro* dos embriões de camundongo clonados.

Além da TSA e de PXD101, o Scriptaid – outro inibidor de HDAC – é também conhecido por melhorar o desenvolvimento dos embriões clonados em bovinos (Akagi et al., 2011) e mini porcos (Zhao et al., 2009). Todos esses estudos sugerem que o

tratamento com HDACi melhoram a taxa de formação de blastocistos em diferente espécies.

Fica claro que a variação entre resultados de diferentes animais e grupos de pesquisa a respeito os efeitos da TSA sobre a produção embrionária na clonagem pode estar relacionada aos efeitos espécie-específicos da TSA, a concentração usada, o momento do tratamento com a droga ou à célula somática utilizada como doadora de núcleo (Cervera et al., 2009).

Os achados deste trabalho suportam a hipótese que essas diferenças na produção embrionária entre animais são devidas ao *status* de metilação global dos tipos celulares e que isso talvez seja um fator determinante relacionado ao sucesso da TNCS. Além disso, o tempo em cultivo e o número de passagens são suficientes para alterar o nível de metilação e acetilação das histonas dos fibroblastos bovinos (Giraldo et al., 2007).

É aceito que a integridade nuclear das células somáticas usadas como doadoras têm papel importante no sucesso da TN (Mastromonaco et al., 2006), em adição à sincronização entre núcleo doador e citoplasma recipiente (Campbell, 1999). O núcleo doador deve estar na fase G0 ou G1 do ciclo celular no momento da transferência nuclear, pois garante uma correta condensação dos cromossomos e correta manutenção da ploidia dos embriões subsequentes (Campbell et al., 1996). Se a célula doadora estiver nas fases S ou G2, o alto nível do fator promotor de maturação (*maturing promoter factor* – MPF) irá causar a pulverização do DNA ou blastômeros com incorreta ploidia, respectivamente (Campbell et al., 1993).

Entretanto, poucos estudos têm caracterizado o *status* epigenético dessas células antes da TN. Os estudos existentes realizaram a caracterização epigenética dos fibroblastos bovinos (Enright et al., 2003; Giraldo et al., 2007; Poehland et al., 2007).

Nosso estudo demonstrou pela primeira vez o *status* global de metilação e hidroximetilação das CTM do tecido adiposo e do fluido amniótico.

Neste estudo, as CTM-TA foram o tipo celular mais hidroximetilado, acompanhado por FIB e CTM-FA, com a menor porcentagem, independente do animal testado. Deste modo, pode-se sugerir que as CTM-TA são o tipo celular que mais facilmente seria reprogramado pela presença de 5-hmc no DNA.

Neste estudo, as células isoladas do tecido adiposo e do fluido amniótico foram caracterizadas como células-tronco mesenquimais por suas características plásticas-aderentes nas condições de cultivo, presença de padrão de expressão de antígenos de superfície (CD29, 44, 73, 90, 105) e ausência de expressão de marcadores hematopoiéticos (CD34) e antígeno comum de linfócitos (CD45). De acordo com Abdulrazzak et al (2010), a combinação entre presença e ausência desses marcadores celulares é essencial para afirmar se as células-tronco são de origem mesenquimal. Além disso, as células do tecido adiposo e fluido amniótico apresentaram capacidade de diferenciação em osteócitos, condrócitos e adipócitos. Este potencial de diferenciação também é um fator essencial para caracterização das CTMs (Pittenger et al.1999).

A mesma classificação baseada em marcadores foi válida para comprovar a presença de CTM obtidas em diferentes fontes e em diferentes espécies, tais como: tecido de granulação periodontal (periodontal granulation tissue) em humanos (Zaganescu et al., 2015); células da geléia de Wharton em búfalos (Sreekumar et al., 2014); membrana amniótica em suínos (Lange-Consiglio et al., 2015); medula óssea de equinos e tecido adiposo de cães (Clark et al., 2016); fluido amniótico em humanos (Benavides et al., 2012; Rota et al., 2012); tecido adiposo em humanos (Ahrari et al., 2013); medula óssea de bovinos (Lu et al., 2013); tecido adiposo e fluido amniótico em

bovinos (Silva et al., 2016b); geléia de Wharton de bovinos (Cardoso et al., 2012, 2017; Silva et al., 2016c).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evidenciou-se diferença entre indivíduos (linhagens) na produção embrionária por transferência nuclear.

O uso de células menos metiladas (células-tronco do fluido amniótico e do tecido adiposo) associado à TSA foi efetivo em aumentar a eficiência de produção de embriões clonados, em um animal (BOV2). Quando as células-tronco foram mais metiladas que os fibroblastos, o uso da TSA não foi suficiente para aumentar a taxa de produção de blastocistos, o que ocorreu em outro animal (BOV1).

O tratamento com TSA resultou em maior número de gestações de embriões TNCS, mas não promoveu sua competência para o completo desenvolvimento.

O uso da TSA foi efetivo em reduzir a expressão de HDAC3 quando foram utilizadas células do fluido amniótico como doadoras de núcleo em comparação ao mesmo tipo celular não tratado, para o animal BOV2. A expressão de HDAC3 foi menor nos embriões reconstruídos com fibroblastos da orelha, resultado estatisticamente semelhante aos reconstruídos com células do tecido adiposo, quando não se utilizou TSA no cultivo embrionário.

A expressão de KTA2A foi maior em embriões tratados com TSA por 20 h quando foram utilizadas células-tronco mesenquimais, independente da fonte, como doadoras de núcleo.

Estudos adicionais devem ser realizados direcionados ao desenvolvimento *in vitro* dos embriões clonados com o uso da TSA. Além disso, deve ser verificada a expressão de um maior número de genes nos embriões clonados, ligados não somente à epigenética (outras HATs e DNMTs) como também à qualidade embrionária e à placentação (tais como: CDX2 – desenvolvimento embrionário precoce, formação do

trofotoderma e subsequente formação da placenta; FGF4 – formação funcional da massa celular interna; IGF-I e IGF-II: desenvolvimento embrionário e crescimento fetal).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. 2010. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *Journal of the Royal Society Interface* 7: S689-S706.

Ahrari I, Zarandi NP, Maharlooei MK, Monabati A, Attari A, Ahrari S. 2013. Adipose tissue derived multipotent mesenchymal stromal cells can be isolated using serum-free media. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 15: 324-329.

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

Baksh D, Song L, Tuan RS. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8: 301-316.

Beebe LFS, McIlpatrick SJ, Nottle MB. 2009. Cytochalasin B and Trichostatin A treatment postactivation improves *in vitro* development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cloning and Stem Cells* 11: 477-482.

Benavides OM, Petsche JJ, Moise KJ, Johnson A, Jacot JG. 2012. Evaluation of endothelial cells differentiated from amniotic fluid-derived stem cells. *Tissue Engineering: Part A* 18: 1123-1131.

Beyhan A, Forsberg EJ, Eilertsen KJ, Kent-First M, First NL. 2007. Gene expression in bovine nuclear transfer embryos in relation to donor cell efficiency in producing live offspring. *Molecular Reproduction and Development* 74: 18-27.

Biggar Y, Storey KB. 2014. Global DNA modifications suppress transcription in brown adipose tissue during hibernation. *Cryobiology* 69: 333-338.

Bird AP, Wolffe AP. 1999. Methylation-induced repression—belts, developmental capacities of *in vitro* matured and fertilized braces, and chromatin. *Cell* 99:451-454.

Blelloch R, Wang A, Meissner A, Pollard S, Smith A, Jaenisch R. 2006. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells* 24: 2007-2013.

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

Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a culture cell line. *Nature* 380: 64-66.

Campbell KHS, Ritchie WA, Wilmut I. 1993. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for

deoxyribonucleic acid replication and development. *Biology of Reproduction* 49: 933-942.

Campbell KHS. 1999. Nuclear transfer in farm animal species. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 10: 245–252.

Cao Z, Hong R, Ding B, Zuo X, Li H, Ding J, Li Y, Huang W, Zhang Y. 2017. TSA and BIX-01294 induced normal DNA and histone methylation and increased protein expression in porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Plos One* 12: 1-15.

Cardoso TC, Ferrari HF, Garcia AF, Novais JB, Silva-Frade C, Ferrarezi MC, Andrade AL, Gameiro R. 2012. 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* 12: 1-11.

Cardoso TC, Okamura LH, Baptistella JC, Gameiro R, Ferreira HJ, Marinho M, Flores EF. 2017. Isolation, characterization and immunomodulatory-associated gene transcription of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells at different trimesters of cow pregnancy. *Cell and Tissue Research* 367: 243-256.

Cervera RP, Marti-Gutierrez N, Escorihuela E, Moreno R, Stojkovic M. 2009. Trichostatin A affects histone acetylation and gene expression in porcine somatic cell nucleus transfer embryos. *Theriogenology* 72: 1097-1110.

Clark KC, Kol A, Shahbenderian S, Granick JL, Walker NJ, Borjesson DL. 2016. Canine and equine mesenchymal stem cells grown in serum free media have altered immunophenotype. *Stem Cell Reviews* 12: 245-256.

Cremonesi F, Corradetti B, Consiglio AL. 2011. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: progress and perspectives. *Theriogenology* 75: 1400-1415.

Darkin-Rattray SJ, Gurnett AM, Myers RW, Dulski PM, Crumley TM, Allocco JJ, Cannova C, Meinke PT, Colletti SL, Bednarek MA, Singh SB, Goetz MA, Dombrowski AW, Polishook JD, Schmatz DM. 1996. Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* 93: 13143–13147.

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

Enright BP, Kubota C, Yang X, Tian XC. 2003. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by Trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biology of Reproduction* 69: 896-901.

Fairburn HR, Young LE, Hendrich BD. 2002. Epigenetic reprogramming: how now, cloned cow? *Current Biology* 12: R68-R70.

- Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ. 2011. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 473:398–402.
- Ghorbani A, Feizpour A, Hashemzahi M, Gholami L, Hosseini M, Soukhtanloo M, Bagheri FV, Khodaei E, Roshan NM, Boskabady MH. 2014. The effect of adipose derived stromal cells on oxidative stress level, lung emphysema and white blood cells of guinea pigs model of chronic obstructive pulmonary disease. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 22:1–12.
- Giraldo AM, Hylan DA, Ballard CB, Purpera MN, Vaught TD, Lynn JW, Godke RA, Bondioli KR. 2008. Effect of epigenetic modifications of donor somatic cells on the subsequent chromatin remodeling of cloned bovine embryos. *Biology of Reproduction* 78: 832-840.
- He N, Dong Z, Zhu B, Nuo M, Bou S, Liu D. 2016. Expression of pluripotency markers in Arbas Cashmere goat hair follicle stem cells. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Animal* 52: 782-788.
- Hendrich B, Bird A. 1998. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Molecular and Cellular Biology* 18: 6538-6547.
- Howlett SK, Reik W. 1991. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development* 113:119-127.
- Iager AE, Ragina NP, Ross PJ, Beyhan Z, Cunniff K, Rodriguez RM, Cibelli JB. 2008. Trichostatin A improves histone acetylation in somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning and Stem Cells* 10: 371-379.
- Jaenisch R, Eggan K, Humpherys D, Rideout W, Hochedlinger K. 2002. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning and Stem Cells* 4: 389-396.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kaas SU, Lansberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics* 19:187-191.
- Kang H, Roh S. 2011. Extended exposure to Trichostatin A after activation alters the expression of genes important for early development in nuclear transfer murine embryos. *The Journal of Veterinary Medical Science* 73: 623-631.
- Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A. 2007. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and *in vitro* surveys. *Stem Cells* 25: 319-331.
- Kim JM, Liu H, Tazaki M, Nagata M, Aoki F. 2003. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *The Journal of Cell Biology* 162: 37–46.
- Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui H-T, Wakayama T. 2006. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment

with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 183–189.

Kurdyukov S, Bullock M. 2016. DNA methylation analysis: choosing the right method. *Biology* 5: 1-21.

Lange-Consiglio A, Corradetti B, Bertani S, Notarstefano V, Perrini C, Marini MG, Arrighi S, Bosi G, Belloli A, Pravettoni D, Locatelli V, Cremonesi F, Bizzaro D. 2015. Peculiarity of porcine amniotic membrane and its derived cells: a contribution to the study of cell therapy from a large animal model. *Cellular Reprogramming* 17: 472-483.

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

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

Liu L, Liu Y, Gao F, Song G, Wen J, Guan J, Yin Y, Ma X, Tang B, Li Z. 2012. Embryonic development and gene expression of porcine SCNT embryos treated with sodium butyrate. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution* 318: 224–234.

Lu T, Huang Y, Wang H, Ma Y, Guan W. 2013. Multi-lineage potential research of bone marrow-derived stromal cells (BMSCs) from cattle. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172: 21-35.

Mastromonaco GF, Perrault SD, Betts DH, King WA. 2006. Role of chromosome stability and telomere length in the production of viable cell lines for somatic cell nuclear transfer. *BMC Developmental Biology* 6: 1-13.

Nervi C, Borello U, Fazi F, Buffa V, Pelicci PG, Cossu G. 2001. Inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A modulates gene expression during mouse embryogenesis without apparent toxicity. *Cancer Research* 61: 1247-1249.

Oback B. 2009. Cloning from stem cells: different lineages, different species, same story. *Reproduction, Fertility and Development* 21: 83-94.

Oh HJ, Lee TH, Lee JH, Lee BC. 2012. Trichostatin A improves preimplantation development of bovine cloned embryos and alters expression of epigenetic and pluripotency genes in cloned blastocysts. *The Journal of Veterinary Medical Science* 74: 1409-1415.

Pazin MJ, Kanogana J.T. 1997. What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 89: 325-328.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.

Poehland R, Al-Rostrum F, Becker F, Viergutz T, Brunner RM, Kanitz W, Bhojwani S. 2007. Donor cell lines considerably affect the outcome of somatic cell nuclear transfer in the case of bovines. *Journal of Reproduction and Development* 53:737-748.

Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407: 86-90.

Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. 1999. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase I. Expression, purification, and comparison of *de novo* and maintenance methylation. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 33002-33010.

Qiu X, You H, Xiao X, Li N, Li Y. 2017. Effects of Trichostatin A and PXD101 on the *in vitro* development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos. *Cellular Reprograming* 19: 1-9.

Rota C, Imberti B, Pozzobon M, Piccoli M, De Coppi P, Atala A, Gagliardini E, Xinaris C, Benedetti V, Fabricio ASC, Squarcina E, Abbate M, Benigni A, Remuzzi G, Morigi M. 2012. Human amniotic fluid stem cell preconditioning improves their regenerative potential. *Stem Cell and Development* 00: 1-13.

Rybouchkin A, Kato Y, Tsunoda Y. 2006. Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biology of reproduction* 74: 1083-1089.

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

Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols* 3: 1101-1108.

Secher JO, Liu Y, Petkov S, Luo Y, Li D, Hall VJ, Schmidt M, Callesen H, Bentzon JF, Sorensen CB, Freude KK, Hyttel P. 2017. Evaluation of porcine stem cells competence for somatic cell nuclear transfer and production of cloned animals. *Animal Reproduction Science* 178: 40-49.

Selokar NL, Saini M, Agrawal H, Palta P, Chauhan MS, Manik R, Singla SK. 2015. Buffalo (*Bubalus bubalis*) SCNT embryos produced from somatic cells isolated from frozen-thawed semen: effect of trichostatin A on the *in vitro* and *in vivo* developmental potential, quality and epigenetic *status*. *Zygote* 24: 549-553.

Selokar NL, Saini M, Agrawal H, Palta P, Chauhan MS, Manik R, Singla SK. 2017. Valproic Acid increases histone acetylation and alters gene expression in the donor cells but does not improve the *in vitro* developmental competence of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos produced by hand-made cloning. *Cellular Reprograming* 19: 1-9.

Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL. 2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311:844–7.

Silva CG, Bão SN, Bessler HC, Cardoso TC, Fonseca LO, Fonseca Neto AM, Godoy SD, Martins GH, Cunha ER, Martins CF. 2016a. Brasília da Cerrados: primeiro bovino clonado utilizando células-tronco mesenquimais do tecido adiposo. *Documentos 330/Embrapa Cerrados*. ISSN 1517-5111, ISSN online 2176-5081.

Silva CG, Martins CF, Cardoso TC, Cunha ER, Bessler HC, Martins GHL, Pivato I, Bão SN. 2016b. Production of bovine embryos and calves cloned by nuclear transfer using mesenchymal stem cells from amniotic fluid and adipose tissue. *Cellular Reprogramming* 18: 127-136.

Silva CG, Martins CF, Cardoso TC, Cunha ER, Bessler HC, McManus CM, Pivato I, Bão SN. 2016c. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from bovine Wharton's jelly and their potential for use in cloning by nuclear transfer. *Ciência Rural* 46: 1830-1837.

Smith CL. 2008. A shifting paradigm: histone deacetylases and transcriptional activation. *Bioessays* 30:15–24.

Sreekumar TR, Ansari MM, Chandra V, Sharma GT. 2014. Isolation and characterization of buffalo wharton's jelly derived mesenchymal stem cells. *Journal of Stem Cell Research and Therapy* 4: 207.

Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.

Svensson K, Mattsson R, James TC, Wentzel P, Pilartz M, MacLaughlin J, Miller SJ, Olsson T, Eriksson UJ, Ohlsson R. 1998. The paternal allele of the H19 gene is progressively silenced during early mouse development: the acetylation *status* of histones may be involved in the generation of variegated expression patterns. *Development* 125: 61-69.

Thuan NV, Kishigami S, Wakayama T. 2010. How to improve the success rate of mouse cloning technology. *Journal of Reproduction and Development* 56: 20-30.

Uribe Yunda DF, Cortes Mancera FM. 2014. Metilación del ADN: implicaciones em carcinogénesis. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 33: 81-93.

Vajta G, Gjerris M. 2006. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. *Animal Reproduction Science* 92: 211-230.

Valinluck V, Sowers LC. 2007. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Research* 67: 946-950.

- Valinluck V, Tsai H-H, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. 2004. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Research* 32: 4100-4108.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwagerl C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology* 33: 1402-1416.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-374.
- Wang YS, Xiong XR, An ZX, Wang LJ, Liu J, Quan FS, Hua S, Zhang T. 2011. Production of cloned calves by combination treatment of both donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology* 75: 819-825.
- Wee G, Shim J-J, Koo D-B, Chae J-I, Lee K-K, Han Y-M. 2007. Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction* 134: 781-787.
- Whitworth KM, Mao J, Lee K, Spollen WG, Samuel MS, Walters EM, Spate LD, Prather RS. 2015. Transcriptome analysis of pig *in vivo*, *in vitro*-fertilized, and nuclear transfer blastocyst-stage embryos treated with histone deacetylase inhibitors postfusion and activation reveals changes in the lysosomal pathway. *Cellular Reprogramming* 17: 243-258.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.
- Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W, Walter J. 2011. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nature Communications* 2:241.
- Xu G-L, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh C-L, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Péquignot E. 1999. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402:187-191.
- Zaganescu R, Tudoran LB, Pall E, Florea A, Roman A, Soanca A, Miha CM. 2015. Ultrastructural evaluation of mesenchymal stem cells from inflamed periodontium in different *in vitro* conditions. *Microscopy Research and Technique* 78: 792-800.
- Zhao J, Ross JW, Hao Y, Spate LD, Walters EM, Samuel MS, Rieke A, Murphy CN, Prather RS. 2009. Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 81: 525-530.

11. ANEXOS

11.1 Anexo A – Exame de DNA do animal BOV1 (Calidora), doador de células para realização da clonagem por transferência de núcleos

RELATÓRIO DE ENSAIO BOVINO (TRIO) Nº 7639166

Proprietário: EMBRAPA CERRADOS - DF - CPF/CNPJ: 00.348.003/0039-93
Endereço: BR 020 KM 18 ROD BRASÍLIA - ZONA RURAL - BRASÍLIA/DF
Propriedade: CENT. DE TRANS. DE TECNOLOGIA DE R. ZEBUINA APT LEITEIRA

Página 01/01

| IDENTIFICAÇÃO | | | |
|-----------------------------|--|-------------------|-------------------------|
| | ANIMAL TESTADO | TOURO | VACA |
| Registrado sob Número | BV245662 | BV47137 | BV56868 |
| Nome do Animal | CALIDORA | DIAMANTE TE BRAS. | AMA |
| Nº de registro | BRGY43 | RRP5640 | BRGR6 |
| Sexo | F | M | F |
| Raça do Animal | GIR | GIR | GIR |
| Data de Nascimento | 11/07/2014 | 05/12/2004 | 30/04/2009 |
| Tipo de Amostra | PELO | LAUDO EXTERNO | LAUDO EXTERNO |
| Responsável pela Coleta | MARCELO RICARDO DE TOLEDO CRMV/ DF 058 Z Amostra coletada em: 15/02/2017 | | |
| Data de Entrada: 24/03/2017 | Ensaio realizado em: 06/04/2017 - 15:33:44 | | Liberado em: 06/04/2017 |

RESULTADO OBTIDO

| | BM1818 | BM1824 | BM2113 | CSRM80 | ETH3 | ETH10 | ETH225 | INRA23 | ILSTS008 | SPS115 | TGLA53 | TGLA122 | TGLA126 | TGLA227 |
|----------------|--------|--------|--------|--------|------|-------|--------|--------|----------|--------|--------|---------|---------|---------|
| RRP5640 | | 180 | 139 | | | 213 | 154 | 208 | | 248 | | 137 | 119 | 77 |
| | | 180 | 139 | | | 213 | 154 | 214 | | 248 | | 153 | 123 | 77 |
| BRGR6 | 268 | 178 | 129 | | | 209 | 154 | 210 | | 248 | | 137 | 121 | 77 |
| | 270 | 180 | 135 | | | 213 | 158 | 214 | | 250 | | 137 | 125 | 79 |
| BRGY43 | 268 | 180 | 135 | 92 | 115 | 209 | 154 | 214 | | 248 | 160 | 137 | 119 | 77 |
| | 268 | 180 | 139 | 102 | 115 | 213 | 154 | 214 | | 250 | 160 | 137 | 125 | 79 |

CONCLUSÃO:

A amostra de PELO identificada como CALIDORA - BRGY43, por teste de exclusão,

"QUALIFICA" com o touro DIAMANTE TE BRAS. - RRP5640. (Relatório cedido pelo LAB. VR GEN - Identificado pelo Nº).

"QUALIFICA" com a vaca AMA - BRGR6. (Relatório cedido pelo LAB. GENE GENEALOGICA - Identificado pelo Nº).

Tendo como verdadeiras as informações de identificação e origem das amostras recebidas.

O Relatório Nº 7639166, revoga os seguintes relatórios anteriores: 763916, 7639161, 7639162, 7639163, 7639164, 7639165.

11.2 Anexo B – Exame de DNA do clone bovino (Acácia) demonstrando completa similaridade com alelos do animal BOV1

RELATÓRIO DE ENSAIO BOVINO (GENOTIPAGEM) Nº 8436015

Proprietário: EMBRAPA CERRADOS - DF - CPF/CNPJ: 00.348.003/0039-93
Endereço : BR 020 KM 18 ROD BRASÍLIA - ZONA RURAL - BRASÍLIA/DF
Propriedade: CENT. DE TRANS. DE TECNOLOGIA DE R. ZEBUINA APT LEITEIRA

Página 01/01

| IDENTIFICAÇÃO | |
|--|--------------------|
| ANIMAL TESTADO | |
| Registrado sob Número | BV270811 |
| Nome do Animal | ACACIA DA CERRADOS |
| Nº de registro | ACACIADACERRADOS |
| Sexo | F |
| Raça do Animal | GIR |
| Data de Nascimento | 00/00/0000 |
| Tipo de Amostra | PELO |
| Responsável pela Coleta | |
| Data de Entrada: 22/08/2017 Ensaio realizado em: 30/08/2017 - 08:25:29 Liberado em: 31/08/2017 | |

RESULTADO OBTIDO

| | BM1818 | BM1824 | BM2113 | CSRM60 | ETH3 | ETH10 | ETH225 | INRA23 | SPS115 | TGLA53 | TGLA122 | TGLA126 | TGLA227 |
|-------------------------|--------|--------|--------|--------|------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| ACACIADACERRADOS | 268 | 180 | 135 | 92 | 115 | 209 | 154 | 214 | 248 | 160 | 137 | 119 | 77 |
| | 268 | 180 | 139 | 102 | 115 | 213 | 154 | 214 | 250 | 160 | 137 | 125 | 79 |

CONCLUSÃO:

A amostra de PELO identificada como ACACIA DA CERRADOS - ACACIADACERRADOS e portador dos alelos acima.

Tendo como verdadeiras as informações de identificação e origem das amostras recebidas.

O relatório de Nº 8436015 revoga os seguintes relatórios anteriores: 843601, 8436011, 8436012, 8436013, 8436014.