Universidade de São Paulo

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Moysés dos Santos Miranda

**Uso de fibroblastos em processo de morte celular
programada como doadores de núcleos na técnica de
transferência nuclear em bovinos**

Pirassununga

2009

Moysés dos Santos Miranda

**Uso de fibroblastos em processo de morte celular
programada como doadores de núcleos na técnica de
transferência nuclear em bovinos**

Tese de Doutorado apresentada à Comissão de Pós
Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos da USP, como parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Doutor em Zootecnia, na área de
concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

Orientador

Pirassununga

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

Miranda, Moysés dos Santos

M672u Uso de fibroblastos em processo de morte celular
programada como doadores de núcleos na técnica de
transferência nuclear em bovinos / Moysés dos Santos Miranda.
-- Pirassununga, 2009.

180 f.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos - Universidade de São Paulo.

Departamento de Ciências Básicas.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

1. Transferência nuclear 2. Morte celular programada 3.
Separação celular. I. Título.

DEDICO

À minha família. Meus pais RAYMUNDO VIEIRA DE MIRANDA e ZUILA ALMEIDA DOS SANTOS e irmã ROSA LUIZA DOS SANTOS MIRANDA, por acreditarem nos meus “sonhos”.

NUNCA me desestimularam, SEMPRE me apoiaram, incondicionalmente. Em vocês, encontro a força que me faz continuar caminhando. Amo vocês.

DEDICO

À minha futura esposa CARLA MARIA FIGUEIREDO DE CARVALHO. A distância física só fez aproximar ainda mais nossos corações e nossa alma. Pode ter certeza que teu caráter, teu respeito, tua força, teu apoio, tua paciência e principalmente TEU AMOR foram fundamentais na realização deste trabalho e me fazem muito feliz ao teu lado. Amo você.

Agradecimentos

A Deus, que é a força maior rege toda a natureza.

Ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles por ter, simplesmente, sido o responsável pela maior mudança profissional da minha vida, ao ter acreditado em mim e ter me proporcionado essa grande oportunidade de trabalhar ao seu lado. Agradeço pela preocupação em me proporcionar todas as etapas de uma formação científica adequada. Tenho uma dívida de gratidão eterna com o senhor. MUITO obrigado.

Ao Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi, pela sua “visão” e discernimento privilegiados. O senhor sabe que se não fossem estas duas qualidades, a execução deste trabalho não teria sido possível. Obrigado por ter acreditado em mim.

À Fabiana Fernandes Bressan, por ter me ajudado em TODAS as repetições experimentais deste trabalho. Sempre disposta a trabalhar, muito inteligente e paciente (especialmente com o citômetro). Também posso tranquilamente dizer que este trabalho é NOSSO.

À Dra. Giovana Merighe, pelo seu apoio técnico e pessoal ao longo desses quatro anos. Não esquecerei seu apoio, especialmente logo quando cheguei ao laboratório. Muito obrigado.

Aos AMIGOS do LMMD, Paulo Roberto Adona, Felipe Perecin, Felipe Braga, Pedro Ratto, Tiago de Bem, Kátia Lancelotti, Alexandre Barreto, Patrícia Porciúncula, Sylvia Cortezzi, Fernando Biase, Weruska Biase e Leonardo (Mototáxi) por acolherem de uma

forma tão carinhosa desde o início e me incentivarem ao longo desse trabalho. Em especial à Lígia Garcia Mesquita e Marcos Chiaratti, pela ajuda fundamental na finalização do trabalho.

Aos AMIGOS da UFPA, Dra. Simone Damasceno, Marcela Cordeiro, Rafael Sampaio, Nathália Guimarães, Flávia Costa Biondi, Thiago Velasco, pelo apoio e confiança dispensados ao longo desse tempo todo. E por me estimularem a retornar e trabalhar novamente com vocês.

Aos AMIGOS de Belém, Danilo Almeida, Hamilton Nascimento, André Barros, Álvaro Ayres, Sérgio Travassos, Ronaldo Júnior pelos ótimos momentos de descontração que compartilhamos pessoalmente ou via internet, ao longo desses quatro anos.

Aos AMIGOS da República em Pirassununga, Antonio Voltolino (Pastel), Frederico Tomita (Meketrefe), Frederico Neves (Sapão), Flávio Perna (Salsicha) pelo convívio agradável na Privada, nossa república.

À Vitrogen, na pessoa de Yeda Watanabe pelo apoio dispensado especialmente no início deste trabalho e pela oportunidade das transferências embrionárias.

Ao Prof. Dr. José Bento Stermann Ferraz, pelo estímulo constante, pelas oportunidades didáticas e pela confiança em mim depositada.

À Patrícia Palma, pelas sugestões valiosas a respeito de citometria e sobre o ensaio da Anexina V.

À Karina Zechinn e ao Dr. Aníbal Vercesi, pelo apoio com as análises do ciclo celular no laboratório de Bioenergética da UNICAMP.

Ao Dr. William Allan King, por ter me dado o privilégio de me aceitar para um período de estágio em seu laboratório e pelas discussões científicas a respeito dos meus resultados.

À comissão de pós graduação da FZEA, pelo apoio e paciência ao longo desses quatro anos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Sumário

Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xvii

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1. Revisão de Literatura	02
1.1 Histórico Breve da Clonagem Animal	02
1.2 Aplicações da Transferência Nuclear.....	04
1.3 A Reprogramação do Núcleo Somático	06
1.4 A Morte Celular Programada por Apoptose.	09
1.5 Via Intrínseca da Morte Celular Programada.....	13

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E ESTABELECIMENTO DE PRENHEZES MEDIANTE O USO DE FIBROBLASTOS BOVINOS EM PROCESSO DE MCP COMO DOADORES DE NÚCLEOS NA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA NUCLEAR (TNS).....	14
Resumo.....	15
Abstract	16
1. Introdução.....	17
2. Hipótese Experimental.....	21
3. Objetivos.....	22
3.1 Geral.....	22
3.2 Específicos	22
3.2.1 <i>Nas Células Somáticas</i>	22
3.2.2 <i>Nos Embriões Reconstruídos</i>	22

4. Material e Métodos	24
4.1 Obtenção e Manutenção das Culturas de Fibroblastos	24
4.2 Determinação do Protocolo de Sincronização do Ciclo Celular	25
4.3 Determinação da MCP nos fibroblastos	25
4.4 Produção dos Embriões Clonados	28
4.4.1 <i>Maturação in vitro dos oócitos bovinos</i>	28
4.4.2 <i>Transferência nuclear – Seleção do corpúsculo polar e enucleação dos oócitos</i>	28
4.4.3 <i>Transferência nuclear – Separações celulares (cell sorting) e reconstrução embrionária com células em processo de MCP</i>	29
4.5 Análise da MCP nos embriões clones	29
4.6 Produção dos embriões partenogénéticos	32
4.7 Transferência embrionária para receptoras sincronizadas e diagnóstico das gestações	32
5.9 Análise Estatística	33
5. Resultados	34
5.1 Determinação do Protocolo de Sincronização do Ciclo Celular	36
5.2 Análise da ocorrência da MCP em fibroblastos bovinos	36
5.3 Produção dos embriões clonados	37
5.4 Resultados das taxas de prenhez	40
6. Discussão	43
7. Resumo dos Resultados	34
8. Conclusões	34

CAPÍTULO 3

USO DE FRIBROBLASTOS BOVINOS EM PROCESSO DE MCP NA TÉCNICA DE TNS: EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM A ESTAUROSPORINA	51
Resumo	52
Abstract	53
1. Introdução	54
2. Justificativa	56

3. Hipótese Experimental.....	57
4. Objetivos.....	58
4.1 Geral.....	58
4.2 Específicos.....	58
4.2.1 <i>Nas Células Somáticas</i>	58
4.2.2 <i>Nos Embriões Reconstruídos</i>	58
5. Material e Métodos	59
5.1 Obtenção e Manutenção das Culturas de Fibroblastos	59
5.2 Protocolo de Sincronização do Ciclo Celular.....	60
5.3 Determinação da Concentração de Estaurosporina (STP) utilizada para a Indução da MCP (Experimento Dose-Resposta)	60
5.4 Determinação do Curso Temporal do Processo de MCP induzido pela STP	61
5.5 Produção dos Embriões Clonados	62
5.5.1 <i>Maduração in vitro dos oócitos bovinos</i>	62
5.5.2 <i>Transferência nuclear – Seleção do corpúsculo polar e enucleação dos oócitos</i> ..	62
5.5.3 <i>Transferência nuclear – Separações celulares (cell sorting) e reconstrução embrionária com células em processo de MCP</i>	63
5.6 Produção dos embriões partenogenéticos.....	65
5.7 Análise Estatística	66
6. Resultados.....	67
6.1 Determinação da concentração de STP utilizada para a indução da MCP	67
6.2 Determinação do curso temporal do processo de MCP induzido pela STP	68
6.3 Produção dos embriões clonados – em Diferentes Tempos após o Estímulo da MCP.	72
7. Discussão.....	77
8. Resumo dos Resultados	84
9. Conclusões	85

CAPÍTULO 4

TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE FIBROBLASTOS BOVINOS EM DIFERENTES FASES DO PROCESSO DE MCP INDUZIDO PELA ESTAUROSPORINA 86

Resumo..... 87

Abstract 88

1. Introdução..... 89

2. Justificativa 92

3. Hipótese Experimental..... 93

4. Objetivos..... 94

4.1 Geral..... 94

4.2 Específicos 94

4.2.1 *Nas Células Somáticas* 94

4.2.2 *Nos Embriões Reconstruídos*..... 95

5. Material e Métodos 96

5.1 Obtenção e Manutenção das Culturas de Fibroblastos 96

5.2 Protocolo de Sincronização do Ciclo Celular..... 97

5.3 Determinação da Concentração de Estaurosporina (STP) utilizada para a Indução da MCP (Experimento Dose-Resposta) 97

5.4 Determinação do Curso Temporal de dois Marcadores do Processo de MCP: exposição da FS e Caspase-9 ativa..... 98

5.5 Produção dos Embriões Clonados 99

5.5.1 *Maturação in vitro dos oócitos bovinos* 99

5.5.2 *Transferência nuclear – Seleção do corpúsculo polar e enucleação dos oócitos* .. 99

5.5.3 *Transferência nuclear – Separações celulares (cell sorting) e reconstrução embrionária com células em processo de MCP* 100

5.6 Morfologia nuclear das células MCP/Anexina e MCP/Caspase-9 utilizadas na reconstrução embrionária e 24h após replaqueamento 103

5.7 Análise da MCP nos embriões clones..... 103

5.8 Produção dos Embriões Fecundados *in vitro*..... 104

5.9 Produção dos Embriões Partenogénéticos..... 105

5.10 Análise da Expressão Gênica dos Embriões	106
5.11 Análise Estatística	108
6. Resultados.....	109
6.1 Determinação da concentração de STP utilizada para a indução da MCP	109
6.2 Determinação do curso temporal de dois marcadores do processo de MCP: exposição da FS (Anexina V) e a ativação da Caspase-9.....	111
6.3 Produção dos embriões clonados – Uso de células em Diferentes Fases da MCP	114
6.4 Morfologia nuclear das células MCP/Anexina e MCP/Caspase-9 utilizadas na reconstrução embrionária e 24h após replaqueamento	117
6.5 Análise da MCP nos embriões clones	119
6.6 Análise da Expressão Gênica dos Embriões	120
7. Discussão.....	121
7.1 Experimento da Dose-resposta e do Curso Temporal dos Marcadores da MCP.....	121
7.1 Produção dos Embriões com células tratadas com STP por 3h e separadas mediante o uso de dois marcadores do processo de MCP	125
7.2.1 Embriões reconstruídos com células MCP/Anexina	125
7.2.1 Embriões reconstruídos com células MCP/Caspase-9	129
8. Resumo dos Resultados	132
9. Conclusões	134
 CAPÍTULO 5	
DISCUSSÃO GERAL E MODELOS HIPOTÉTICOS	135
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

Lista de Figuras

- Figura 1.** Características da morte celular programada por apoptose em comparação com a morte por necrose (extraído e adaptado de GEWIES, 2003) 10
- Figura 2.** Ilustração das duas principais vias de indução da MCP. Na via extrínseca (A), depois da ligação do ligante ao receptor de morte celular trimérico, este último recruta moléculas adaptadoras via seus domínios de morte intracelulares (DD) que além de possuírem os domínios DD possuem domínios efetores de morte celular (DED), os quais por sua vez, recrutam a pro-caspase-8 para o complexo que então se ativa por clivagem autoproteolítica e forma a caspase-8 ativa, ativando na sequência, as caspases efetoras para a execução da MCP. Na via intrínseca (B), diferentes estímulos apoptóticos estimulam a liberação do citocromo C que induz a formação de uma estrutura heptamérica em forma de cata-vento, o apoptossomo. As moléculas de pro-Caspase-9 se ligam ao cerne do apoptossomo e são ativadas por dimerização. Os dímeros de Caspase-9 ativa estimulam a ativação das caspases efetoras (extraído e adaptado de GEWIES, 2003) 12
- Figura 3.** Número crescente de publicações sobre a TNS ao longo do tempo por grupo de espécies. Foram incluídas somente publicações *peer-reviewed* listadas no *PubMed*. Na categoria "não especificado", estão incluídos artigos que não mencionam uma espécie em particular (revisões gerais, por exemplo). "Outras" representam as outras espécies nas quais a TNS vem sendo estudada. (Extraído e adaptado de OBACK e WELLS, 2007)..... 17
- Figura 4.** Eficiência do desenvolvimento de blastocistos e desenvolvimento embrionário a termos em camundongos e bovinos. (A) Percentual de desenvolvimento de embriões derivados de fertilização *in vitro* (IVF) e a TNS (NT) nas duas espécies. (B) Percentual de sobrevivência, a termo, após a transferência de embriões fertilizados *in vitro* (IVF) e clonados (NT) nas duas espécies. (Retirado e adaptado de YANG *et al.*, 2007) 18
- Figura 5.** Resumo da sequência de procedimentos utilizados em cada uma das duas estratégias utilizadas para a sincronização do ciclo celular dos fibroblastos 26
- Figura 6.** Ilustração do ensaio da Anexina V/ iodo de propídeo. São geradas quatro possibilidades no ensaio. (A) Na célula viva não há nenhuma marcação; (B) Na célula em MCP ocorre apenas a exposição da FS na face externa da membrana plasmática e marcação com a Anexina V conjugada com um fluorocromo (FITC no exemplo acima); (C) Na célula em MCP tardia, além da exposição da FS com marcação pela Anexina a membrana plasmática celular sofre colapso e se torna permeável ao iodo de propídeo fazendo com que a célula possua uma dupla marcação (Anexina V e iodo de propídeo); (D) Na célula em processo de necrose, ocorre somente a permeabilização da membrana plasmática com a conseqüente marcação pelo iodo de propídeo, não havendo a externalização da FS 27

Figura 7. (A) Foto do citômetro de fluxo (BD FACSaria) utilizado nos experimentos. (B) *dot plot* mostrando o padrão da observação das células analisadas por citometria de fluxo, com os quadrantes mostrando as categorias de células de acordo com a marcação com a Anexina V e com o iodeto de propídeo. As setas indicam as populações celulares separadas (*cell sorting*) que foram utilizadas na TNS..... 29

Figura 8. Fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* com aproximadamente 60% de confluência (100X)..... 34

Figura 9. Resultado das análises do ciclo celular de fibroblastos bovinos sincronizados pela restrição de soro ou pelo uso da roscovitina. Mesmo em culturas com 60% de confluência, 24h de restrição de SFB foram suficientes para sincronizar a maioria das células em fase G1/G0 do ciclo celular, não diferindo dos resultados obtidos com 48h a mais de restrição de SFB tanto com 60% de confluência (72h Restrição) quanto em confluência (Conf./Restr. 72h); (Ciclando) Culturas em crescimento não sincronizadas (Conf./Restr. 72h); Culturas confluentes sincronizadas pela restrição de soro (0,5%) por 72h; (24 Restrição) culturas com 60% de confluência sincronizadas pela restrição de soro por 24h; (72h Restrição) culturas com 60% de confluência sincronizadas pela restrição de soro por 72h; (24h Roscovitina) culturas com 60% de confluência tratadas com Roscovitina (10µg/mL) por 24h. Sobre escritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). 35

Figura 10. *Dotplot* gerado pelo citômetro de fluxo no qual é mostrado o padrão de leitura da marcação das células pela Anexina V (eixo X) e iodeto de propídeo (eixo Y) e os respectivos quadrantes gerados. (A) *dot plot* de células não coradas. Esta análise serviu para o ajuste dos quadrantes a partir da fluorescência basal emitida pelas células (background) para os dois corantes analisados; (B) *Dot plot* da análise das células coradas com a Anexina V e o iodeto de propídeo. Os valores de cada sub população presente em cada um dos quadrantes é calculado pelo equipamento em valores percentuais. Notar que nesta amostra a taxa de MCP foi de 11,0%. 36

Figura 11. Valores médios das taxas de MCP, Necrose e MCP tardia analisadas em culturas de fibroblastos em regime de restrição de SFB por 24h. A taxa média de MCP obtida foi de 15,1% 37

Figura 12. Fotomicrografias de embriões clonados a partir de células Vivas (A) e em MCP (B), submetidos à técnica de TUNEL e fotografados em microscópio de fluorescência. Os núcleos TUNEL-positivos foram corados em verde (A'- B') e o Hoechst 33342 (10µg/mL) foi utilizado para coloração de todos os núcleos embrionários (A-B). Pontas de setas indicam exemplos de núcleos com o DNA fragmentado. Aumento de 200X. 39

Figura 13. Resultados da taxa de prenhez (eixo Y direito) e de manutenção da prenhez (eixo Y esquerdo) de embriões clonados a partir de três categorias de células (Controle, MCP e Vivas) aos 30, 60 d e nascimento. Os percentuais de prenhez foram calculados levando em consideração o número de transferências embrionárias de cada grupo e os valores de manutenção de prenhez foram calculados a partir do número de animais gestantes no exame ultrassonográfico de 30 d 42

Figura 14. Bovino clonado a partir de uma célula em processo de MCP. A bezerra Nelore nasceu pesando 35 kg, porém teve parada cardíaca em menos de 24h de vida, provavelmente por apresentar problemas cardio-respiratórios..... 42

Figura 15. *Dot plot* gerado pelo citômetro de fluxo no qual é mostrado o padrão de leitura da marcação das células pela Anexina V (eixo X) e iodeto de propídeo (eixo Y) e os respectivos quadrantes gerados. (A) *dot plot* de células não coradas para ajuste da fluorescência basal (*background*); (B) *Dot plot* da análise das células coradas com a Anexina V e o iodeto de propídeo mostrando os quadrantes e os dois *gates* desenhados (Separ. Vivas e Separ. MCP) de modo a gerar um espaço de segurança entre as duas populações separadas..... 64

Figura 16. Fotomicrografia do cultivo celular do experimento dose-resposta de STP. As células foram coradas por 10 minutos com Hoechst (5µg/mL) e visualizadas em microscópio sob a luz comum (morfologia celular) e ultravioleta (núcleos em azul). (A) células do grupo controle não tratadas com STP e (B) células tratadas com 50µM de STP por 24h (aumento 200X). 67

Figura 17. Gráfico dos resultados do experimento para determinação da concentração de STP. Os fibroblastos foram tratados com a droga por 24h e analisados por citometria de fluxo quanto à marcação com a Anexina V e iodeto de propídeo. Asteriscos indicam diferença estatística ($p < 0,05$) dentro de cada categoria de células..... 68

Figura 18. *Dot plots* onde pode ser observado o padrão de leitura da marcação das células pela Anexina V (eixo X) e iodeto de propídeo (eixo Y) após o tratamento com 50µM de STP por 1, 12 e 24h (Controle, não tratado). O ajuste da fluorescência basal foi feito mediante a leitura de uma amostra de células não coradas (*Background*). Os valores obtidos em cada quadrante analisado são mostrados no gráfico. 69

Figura 19. Curso-temporal da marcação da Anexina V em fibroblastos tratados com 50µM de STP por 1, 12 e 24h ($p > 0,05$). 70

Figura 20. Fotomicrografia de fibroblastos bovinos tratados com 50 µM de STP por diferentes tempos. Os núcleos celulares (em azul) foram coradas com Hoechst 33342 (10 µg/mL) e fotografados em microscópio equipado com fluorescência. As imagens representam uma sobreposição de imagens obtidas com o contraste de fase em luz comum e luz U.V. (CTRL) células não tratadas com STP. As células foram tratadas com STP por 1, 12 e 24h conforme indicado nas figuras. Notar a grande mudança na morfologia dos fibroblastos tratados com a STP já com 1h. Não foi verificado sinal de fragmentação nuclear ao longo do tratamento. Aumento de 100X. 71

Figura 21. *Dot plot* retirado do artigo de Clodi *et al.* (2000) onde é mostrado o padrão de marcação da Anexina V (eixo vertical) ao longo da escala de tamanho celular (eixo horizontal, *forward scatter*) e os três *gates* desenhados (retângulos) utilizados para o isolamento de três subpopulações celulares. Foram separadas a subpopulação celular negativa para a marcação da Anexina V (AxVneg), a subpopulação positiva para a marcação, porém com uma baixa intensidade de fluorescência (AxVlo) e com alta intensidade de fluorescência (AxVhi). 82

Figura 22. *Dot plots* gerados pelo citômetro de fluxo nos quais é mostrado o padrão de leitura da marcação das células pela Anexina V ou Caspase-9 (eixo X) e iodeto de propídeo (eixo Y) e os respectivos quadrantes gerados. (A) *Dot plot* da análise das células coradas com a Anexina V e o iodeto de propídeo, mostrando os quadrantes e o *gate* desenhado (Separadas) para a separação celular; (B) *Dot plot* da análise das células coradas com a Caspase-9 e o iodeto de propídeo mostrando os quadrantes e o *gate* desenhado (Separadas) para a separação celular. 101

Figura 23. Gráfico dos resultados do experimento para determinação da concentração de STP. Fibroblastos foram tratados com STP por 24h e analisados por citometria de fluxo quanto à marcação com a Anexina V e iodeto de propídeo 110

Figura 24. Resultados do experimento de curso-temporal da Anexina V e da Caspase-9 em fibroblastos tratados com 50µM de STP por 3, 12 e 18h..... 111

Figura 25. Fotomicrografias da morfologia nuclear de fibroblastos bovinos tratados com 10µM de STP em diferentes tempos. Os fibroblastos foram corados com 10µg/mL de Hoechst 33342 e analisados em microscópio de fluorescência. Um grupo de células não tratadas serviu como Controle. Aumento de 100X 113

Figura 26. Fotomicrografias de fibroblastos bovinos tratados com 10µM de STP por 3h submetidos à técnica de TUNEL. Os núcleos TUNEL-positivos foram corados em verde (A'- D') e o Hoechst 33342 (10µg/mL) foi utilizado para corar todos os núcleos das células (A-D). (A, A') controle negativo da técnica. (B, B') controle positivo da técnica. (C, C') células Controle não tratadas com STP. (D, D') células tratadas com 10 µM de STP por 3h. Aumento de 100X..... 115

Figura 27. Quantificação da fragmentação nuclear dos fibroblastos utilizados na TNS. A análise das células dos três grupos experimentais (Controle, MCP/Anexina e MCP/Caspase-9) foi realizada imediatamente após a reconstrução embrionária (Momento da TNS) e 24h depois do replaqueamento (24h depois). a, b, c, d Indicam diferença significativa entre os momentos de análise dentro do mesmo grupo de células (teste do X², p<0,05). Valores entre parêntese representam o número amostral. 117

Figura 28. Imagens de fibroblastos remanescentes da gota de micromanipulação que foram avaliados com relação à fragmentação nuclear no momento da TNS (Momento da TNS) e 24h depois do replaqueamento em meio de cultivo sem a STP (24h depois). Os grupos Controle (A, A', B, B'), MCP/Anexina (C, C', D, D') e MACP/Caspase-9 (E, E', F, F') foram analisados no Momento da TNS e 24h depois conforme indicado. Para a análise da morfologia nuclear os fibroblastos foram corados com o Hoechst 33342 (10µg/mL) e fotografados em microscópio de fluorescência. As células fotografadas no momento da clonagem são as mesmas células replaqueadas, fotografadas 24h depois. As pontas de setas indicam núcleos considerados como fragmentados..... 118

Figura 29. Expressão relativa dos transcritos dos genes OCT-4 e INF- τ em embriões clonados a partir de fibroblastos MCP/Anexina, MCP/Caspase-9 e células Controle em relação à expressão de embriões FIV ($p>0,05$). 120

Figura 30. Modelo hipotético gráfico do que ocorre quando células com estímulo incompleto de MCP são utilizadas como doadoras de núcleo para a TNS, o que se aplica as células dos Capítulos 2 e 3. (A) Ilustração da célula somática com estímulo insuficiente de morte antes da fusão com o oócito, podendo ser observado que apesar de balanço das proteínas pró- e antiapoptóticos estar ligeiramente alterado (A-1), não há liberação do citocromo C (A-2) fazendo com que a célula não complete o processo de MCP. (B) Ilustração do momento da fusão da célula somática ao oócito enucleado. Durante a fusão, o ligeiro desbalanço das proteínas pró- e anti-apoptóticas presentes nas células (B-1 e B-2) interage com o balanço destas proteínas presentes no interior do citoplasma do oócito enucleado (B-3) promovendo um desbalanço acentuado no oócito (B-4) de modo a interferir no mecanismo de MCP do oócito/embrião (B-5). 143

Figura 31. Modelo hipotético gráfico do que ocorre quando células com estímulo completo de MCP são utilizadas como doadoras de núcleo para a TNS. O que se aplica as células do Capítulo 4. **(A)** Ilustração da célula somática com estímulo completo de morte antes da fusão com o oócito. Mediante o estímulo da STP, ocorre um desbalanço das proteínas pró- e anti-apoptóticas (A-1), seguido pela liberação do citocromo c (A-2), formação do apoptossomo que contem a Caspase-9 ativa (A-4), que por sua vez ativa a Caspase-3 (A-5) que causa a fragmentação do DNA (A-6). Há a possibilidade de que o desbalanço das proteínas pró- e anti-apoptóticas pode também liberar o AIF da mitocôndria (A-7) que pode levar a fragmentação do DNA independentemente de caspases. **(B)** Ilustração do momento da fusão da célula somática MCP/Anexina utilizada no Capítulo 4. Provavelmente a célula já tinha ultrapassado a fase de desbalanço (B-1) e já teria liberado o citocromo c (B-2) ou mesmo o AIF (B-3), porém não tinha entrado na fase execução. A introdução desta célula no citoplasma do oócito enucleado não afetou o desbalanço das proteínas (B-4) e então o processo foi revertido por fatores desconhecidos, talvez IAPs de origem oocitária ou mesmo oriundas da somática (B-6). **(C)** Ilustração do momento da fusão da célula somática MCP/Caspase-9 utilizada no Capítulo 4. Uma vez que estas células foram positivas para a Caspase-9 ativa, já havia ocorrido a fase de desbalanço das proteínas pró- e anti-apoptóticas (C-1), permeabilização mitocondrial (C-2), liberação do citocromo c (C-3) e ativação da Caspase-9 (C-4). Uma vez inserida no interior do citoplasma do oócito enucleado, a Caspase-9 não levou a ativação da Caspase-3 (C-5) em função da própria natureza do kit utilizado que se baseava na utilização de um inibidor de Caspase-9, se presente o AIF foi inibido algum mecanismo desconhecido (C-6) e o mecanismo de balanço das proteínas oocitárias não foi alterado (C-7) uma vez que as células já se encontravam em uma fase mais avançada do processo 120

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resultados do experimento de TNS com fibroblastos adultos, não tratados com STP, separados por citometria de fluxo com relação à marcação com a Anexina V.....	38
Tabela 2. Resultados da contagem do número de células total, percentual de núcleos em MCP e do índice de MCP de embriões clonados a partir de fibroblastos adultos, não tratados com STP, separados por citometria de fluxo com relação à marcação com a Anexina V. ...	40
Tabela 3. Resultados das taxas de prenhez de embriões clonados a partir de fibroblastos adultos separados, por citometria de fluxo, com relação à ocorrência da MCP mediante o ensaio da marcação com a Anexina V	41
Tabela 4. Resultados da TNS a partir das três categorias de células oriundas de culturas tratadas com 50 μ M de STP por diferentes tempos	73
Tabela 5. Resultados da TNS, por categoria de célula utilizada como doadora de núcleo, nos três diferentes tempos após o tratamento com 50 μ M de STP	75
Tabela 6. Resultado em conjunto, unindo-se os resultados dos três diferentes tempos de tratamento com a STP, da TNS a partir de diferentes categorias de células separadas por citometria de fluxo de acordo com o padrão de marcação com a Anexina V	76
Tabela 7. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação relativa dos genes, o tamanho do fragmento e seu respectivo código de acesso no GenBank.....	108
Tabela 8. Resultado do desenvolvimento embrionário de clones reconstruídos a partir de células em MCP tratadas por 3h com 10 μ M de STP e separadas por citometria de fluxo de acordo com a marcação para a Anexina V ou Caspase-9.....	116
Tabela 9. Resultados da contagem do número de células total, percentual de núcleos em MCP e do índice de MCP de embriões clonados a partir de fibroblastos adultos tratados com 10 μ M de STP por 3h e separados por citometria de fluxo de acordo com a marcação com a Anexina V (MCP/Anexina) ou a Caspase-9 (MCP/Caspase-9).	119

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1) Revisão de Literatura

1.1) Histórico breve da clonagem animal.

Em bovinos, o desenvolvimento de biotecnologias da reprodução como a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões tem impulsionado grandemente as pesquisas reprodutivas na espécie. Mais recentemente, a TNS de bovinos provou ser uma técnica possível de ser executada apesar de possuir uma eficiência ainda muito baixa (HEYMAN, 2005).

Originalmente proposta por Spemann em 1938 como um método de estudo da diferenciação celular a técnica da transferência nuclear foi somente realizada pela primeira vez com sucesso por Briggs e King em 1952, que utilizaram blastômeros de anfíbios como doadores nucleares. Subseqüentemente, John Gurdon demonstrou a possibilidade da reprogramação de células diferenciadas mediante a produção de sapos adultos (*Xenopus leavis*) utilizando como doadoras de núcleos células epiteliais do intestino de larvas em desenvolvimento (CAMPBELL *et al.*, 2005).

Em mamíferos, o desenvolvimento da tecnologia ocorreu mais lentamente. Os primeiros experimentos de Bromhall em 1975 utilizando coelhos não funcionaram sendo o primeiro relato de nascimento de clones mamíferos feito em 1981 por Karl Illmense e Peter Hoppe que anunciaram o nascimento de três camundongos clonados a partir de células embrionárias. Entretanto diversos laboratórios ao redor do mundo tentaram, sem sucesso, repetir o feito. McGRATH e SOLTER (1984) mostraram que os zigotos enucleados possuíam uma capacidade limitada de garantir desenvolvimento quando utilizados como receptores de núcleos embrionários de estádios mais adiantados do desenvolvimento, assim como foi observado alguns anos depois (1989) em suínos por Prather e

colaboradores (CAMPBELL *et al.*, 2005) o que acabou levantando suspeitas sobre a veracidade das informações divulgadas pelos pesquisadores.

O uso de oócitos enucleados na fase de metáfase II como receptores de núcleos pareceu na época ser mais eficiente como demonstrado pela produção de ovelhas vivas clonadas a partir de blastômeros de embriões de 8-16 células (WILLADSEN, 1986) sendo essa mesma metodologia aplicada também com sucesso em bovinos (ROBL *et al.*, 1987) e em suínos (PRATHER *et al.*, 1989). Entretanto limitações importantes foram identificadas no processo de TNS, como a baixa taxa de desenvolvimento embrionário o que limitava a quantidade de animais idênticos a serem produzidos, limitação da quantidade de células (blastômeros) disponíveis para a transferência nuclear, além da descoberta da importância e necessidade do controle do ciclo celular dos blastômeros, para o sucesso da técnica (SMITH *et al.*, 1988).

Para superar esses problemas, a busca por uma célula doadora que poderia ser mantida em cultura em grandes quantidades, tornou-se a linha de pesquisa de muitos grupos científicos. Células tronco embrionárias foram propostas como esse tipo celular ideal por Wilmut *et al.* (1992) e o uso destas células indicou que poderiam ser utilizadas como doadoras de núcleo (SIMS e FIRST, 1994; WAKAYAMA *et al.*, 1999; HUMPHERYS *et al.*, 2001). Desde então, apesar de células tronco embrionárias terem sido isoladas de várias espécies e utilizadas como doadoras de núcleo, células tronco verdadeiras não foram ainda isoladas de animais de produção o que ainda limita sua utilização para TNS pela dificuldade de caracterização biológica e manutenção em laboratório (CAMPBELL, 2005).

O uso de um tipo celular específico como doador de núcleos para a TNS, tornou-se uma abordagem importante para o entendimento das interações núcleo citoplasmáticas que ocorrem no processo da transferência nuclear. Tais estudos levaram ao uso de células mantidas em cultura o que resultou no nascimento de proles viáveis em 1995 (CAMPBELL *et al.*, 1996b). Os autores mostraram que apesar de as células utilizadas neste estudo terem tido origem embrionária, expressavam marcadores de células diferenciadas (citoqueratina e lâmina A/C). Logo em seguida, a mesma

equipe de pesquisadores, confirmou seus resultados indo mais além ao produzir ovelhas vivas clonadas a partir de células somáticas fetais. Finalmente Wilmut *et al.* (1997) reportaram o nascimento da ovelha *Dolly*, o primeiro mamífero clonado a partir de células somáticas adultas cultivadas em laboratório (transferência nuclear somática – TNS).

1.2) Aplicações da transferência nuclear somática.

Desde o nascimento da ovelha *Dolly* (WILMUT *et al.*, 1997), a TNS vem sendo realizada com sucesso em muitas espécies de mamíferos, como gado bovino, camundongos, cabras, porcos, coelhos, gatos, ratos, cavalos, mulas, cervos, cachorro, furão, búfalos (SHI *et al.*, 2007) e lobos (KIM *et al.*, 2007) entre outras. Com poucas modificações que se adaptam as peculiaridades de cada espécie, basicamente a técnica consiste na introdução de uma célula somática dentro do citoplasma de um oócito enucleado que é capaz de reprogramar o núcleo somático fazendo-o readquirir a totipotência de modo a gerar um novo embrião e até mesmo um novo indivíduo (SMITH e MURPHY, 2004).

A TNS tem gerado possibilidades excitantes tanto para a pesquisa básica quanto para a pesquisa aplicada. Do ponto de vista aplicado, há os mais variados exemplos. Em 1998 um grupo da Nova Zelândia mostrou que a TNS pode contribuir para a preservação de espécies ameaçadas de extinção ao clonarem a única fêmea bovina de uma raça extinta chamada *Enderby Island* (WELLS *et al.*, 1998) o que permitiu a geração de 20 novas fêmeas que serão inseminadas artificialmente utilizando-se sêmen criopreservado de animais da mesma raça antes da extinção.

A TNS pode contribuir também para a produção de grupos de animais que podem ser utilizados como modelos animais mais homogêneos para propósitos experimentais permitindo assim reduzir o número de animais necessários para estudos de longa duração de patologias ou nutrição por exemplo. Desta forma o efeito da diferença genética individual poderia ser

eliminado de modo a se obter dados mais precisos da fisiologia e desempenho zootécnico dos animais, especialmente em características de alta herdabilidade como a produção de leite, por exemplo, (HEYMAN, 2005).

A possibilidade de realizar modificações nas células doadoras de núcleo antes da sua utilização na TNS proporciona uma possibilidade muito grande de produzir animais geneticamente modificados para os mais diferentes propósitos.

Schineke *et al.* (1997) produziram ovelhas que expressam no seu leite o fator IX de coagulação sanguínea, muito útil no tratamento de hemofilias, Bleck *et al.* (1998) produziram suínos expressando em seu leite a proteína α -lactalbumina bovina, Denning *et al.* (2001) produziram ovelhas cujos genes da α -1-3-galactosiltransferase (responsável pela rejeição aguda a transplantes) e da proteína Priônica PrP (responsável pela doença da “vaca louca” ou encefalite espongiforme) foram removidos do genoma assim como Dai *et al.* (2002) que produziram suínos sem o gene da rejeição aguda, ambos os trabalhos visando à utilização de órgãos para xenotransplantes.

Brophy *et al.* (2003) produziram bovinos clonados que expressavam altos níveis de β e κ -caseína no leite visando o melhor rendimento na produção de queijo, Wall *et al.* (2005) produziram fêmeas bovinas que produzem em seu leite um gene de resistência a infecção por *Staphylococcus aureus*, sendo, portanto vacas resistentes a mastite, Lai *et al.* (2006) produziram suínos cuja carne possui níveis elevados de ômega-3 que são ácidos graxos benéficos à saúde humana.

A multiplicação de animais com alto mérito genético também é uma possibilidade aplicada da TNS, Smith (2000) clonaram um reprodutor bovino de alto mérito genético que já estava morto, a partir de células da pele do animal que haviam sido congeladas previamente à sua morte. No Brasil, Meirelles *et al.* (2006) reportaram o nascimento de vários animais de considerados de “elite”, entretanto os autores alertam para a necessidade da escolha criteriosa dos animais a serem clonados para que ocorra efetivamente um impacto positivo no melhoramento dos rebanhos.

Oback e Wells (2007) relatam que no sentido do ganho genético dos rebanhos, a TNS também pode proporcionar ajuda substancial quando aplicada em animais cruzados (geração F1) ou mesmo raças compostas, por exemplo, de modo a maximizar os efeitos da heterose e favorecer a manutenção de combinações favoráveis de alelos nos indivíduos heterozigotos, que seriam segregados somente na geração F2.

Meirelles *et al.* (2006) propõem ainda que especialmente quando for possível realizar a TNS em larga escala em bovinos, esta poderá contribuir muito para a produção animal, pois permitiria o desenvolvimento de linhagens, que a semelhança das aves e suínos, poderiam trazer homogeneidade genética para o rebanho multiplicando o melhor animal para uma dada característica, manejo, etc.

Possibilidades recentes são: a produção de anticorpos monoclonais humanos em bovinos clonados (ROBL, 2007) e TNS de animais a partir de células epiteliais isoladas de sêmen de animais adultos (NEL-THEMAAT *et al.*, 2008).

1.3) A reprogramação do núcleo somático.

Como descrito por VAJTA e GJERRIS (2006), considerando-se a perfeição com a qual o material genético é manipulado no processo normal de desenvolvimento dos gametas e posterior fecundação, é simplesmente um “milagre” que a intrusão drástica do material genético de uma célula somática no interior de um oócito enucleado ainda resulte em desenvolvimento embrionário, fetal e gere indivíduos vivos.

De fato a técnica de TNS ainda é uma tecnologia com uma eficiência muito baixa. Na técnica de TNS, são reportadas, várias alterações do padrão normal, natural, de produção de um novo indivíduo da espécie. Dentre as anormalidades, podemos dividi-las em anormalidades de curto-prazo que são detectáveis desde o início do desenvolvimento embrionário pré-implantação e anormalidades de longo-prazo, que são detectadas na

fase fetal ou mesmo após o nascimento dos animais clonados (VAJTA e GJERRIS, 2006). Por conta destas dificuldades, que se acumulou e ainda se acumulam muitos conhecimentos sobre o funcionamento de mecanismos biológicos básicos inerentes ao processo da TNS.

Embora pesquisas tenham sido realizadas avaliando-se os efeitos nas proteínas da matriz nuclear (MOREIRA *et al.*, 2003), componentes do envelope nuclear (KUBIAK *et al.*, 1991), componentes nucleolares (KANKA *et al.*, 1999), fragilidade ou anomalias cromossômicas nos embriões clonados (SLIMANE-BUREAU E KING, 2002) e a distribuição inadequada das células do trofoblasto e do embrioblasto (KOO *et al.*, 2002) afetando a eficiência da técnica. Sem dúvida, a falha na reprogramação do núcleo somático para um estágio embrionário, é uma das principais causas da ineficiência na obtenção de indivíduos clonados.

O mecanismo molecular preciso que envolve a base da reprogramação nuclear responsável pela ativação e repressão dos genes específicos nos embriões reconstruídos ainda é um mistério a ser esclarecido (RIDEOUT III *et al.*, 2001; HAN *et al.*, 2003; SHI *et al.*, 2003; JOUNEAU e RENARD, 2003). Em uma contextualização teórica da reprogramação nuclear, Rideout III *et al.*, (2001) propuseram três possibilidades: (i) não ocorrência da reprogramação do genoma somático, resultando na imediata morte do embrião; (ii) reprogramação parcial, permitindo uma sobrevivência inicial dos clones, mas resultando em fenótipos anormais e/ou apresentando mortalidade em vários estádios do desenvolvimento embrionário/fetal/neonatal; (iii) reprogramação completa do genoma, com a produção de indivíduos clonados normais e saudáveis.

Sabe-se que durante o desenvolvimento normal, mesmo logo após a fecundação, ocorre uma série de modificações bem orquestradas no padrão de metilação do DNA e no padrão de modificação das histonas (alterações epigenéticas) do genoma embrionário recém-formado (SANTOS e DEAN, 2004), e que tais modificações possuem um papel fundamental no estabelecimento de um estado de cromatina permissivo a expressão de

genes associados ao desenvolvimento embrionário normal (BLELLOCH *et al.*, 2006).

Ao contrário, embriões derivados da técnica de TNS apresentam tipicamente padrões anormais de metilação de DNA e de modificações das histonas (SANTOS *et al.*, 2003; KANG *et al.*, 2001; DEAN *et al.*, 2001; BOURC'HIS *et al.*, 2001). Esse padrão anormal pode explicar as falhas de expressão de genes importantes para o desenvolvimento (inclusive os genes *imprinted*), que são reportadas em muitos estudos com embriões clonados (HUMPHERYS *et al.*, 2002; CEZAR *et al.*, 2003; SEBASTIANO *et al.*, 2005; WRENZYCKI *et al.*, 2005). Por sua vez, o padrão alterado de expressão gênica dos embriões clones pode explicar o posterior potencial de desenvolvimento a termo.

Behyan *et al.* (2007) analisaram a expressão de genes associados à manutenção do padrão epigenético (histona desacetilases-1, -2 e -3) e pluripotência celular (OCT-4) em embriões bovinos clonados a partir de células com alto e baixo potencial de desenvolvimento, e mostraram que diferenças de expressão de genes importantes para o desenvolvimento podem caracterizar a eficiência do processo de TNS em produzir indivíduos viáveis. Em particular, o gene OCT-4 (Pou5f1) codifica uma proteína de ligação do DNA de domínio POU e é expresso em células embrionárias pluripotentes e células germinativas (PESCE e SCHOLER, 2001) sendo sua expressão fundamental para a manutenção da pluripotência uma vez que embriões deficientes em OCT-4 diferenciam espontaneamente para células do trofotoderma (NIWA *et al.*, 2000) além de que, como mostrado recentemente, trata-se de um dos 4 genes cuja reativação possibilitou a diferenciação de células adultas em células embrionárias (TAKAHASHI *et al.*, 2007). Vários estudos têm mostrado que o padrão de expressão do gene OCT-4 é anormal em muitos embriões clonados que são produzidos a partir de células adultas (BOIANI *et al.*, 2002; BARTVIN *et al.*, 2003; YAMAZAKI *et al.*, 2006; WUENSCH *et al.*, 2007).

Após a transferência dos blastocistos clonados para o útero de receptoras, as perdas peri-implantação são consideráveis. Em bovinos, a proporção de gestações iniciadas que falham durante esse período podem ser estimadas em 50% (HEYMAN, 2005). Além do mais, muitas patologias são descritas em conceitos e neonatos derivados da transferência de núcleo somática (CIBELLI *et al.*, 2002; HILL, 2002; PANARACE *et al.*, 2007). Segundo revisão de Vajta e Gjerris (2006), em ovelhas, bovinos e camundongos já foram reportados: anormalidades placentárias, crescimento anormal do feto (chamada de síndrome da prole gigante) e gestação prolongada; hipóxia, falha respiratória, problemas circulatórios e perda de vigor pós-natal; aumento de temperatura ao nascimento; malformações do trato urogenital (hidronefrose e hipoplasia testicular); malformações de fígado e cérebro; disfunção imune, hipoplasia linfóide, anemia e atrofia tímica; infecções bacterianas e virais.

Em uma abordagem recente e interessante sobre as falhas no processo de TNS, Yang *et al.* (2007) propõem que a maioria destes defeitos ocorrem em um estágio posterior de reprogramação nuclear e que podem ser atribuídos a problemas como o desenvolvimento e funcionamento inadequado da placenta mais do que do feto em si. Os autores se baseiam, entre outras evidências, na observação de que apesar dos embriões clonados apresentarem uma alta taxa de falha de desenvolvimento quando transferidos para receptoras, células tronco embrionárias, derivadas destes mesmos embriões, parecem ser funcionalmente normais.

1.4) A morte celular programada (MCP) por apoptose.

A manutenção da homeostasia tecidual nos organismos multicelulares é assegurada por diferentes mecanismos biológicos regulatórios, entre os quais figura a MCP. O termo apoptose (do grego *apó* = separação, *ptôsis* = queda), adotado pela primeira vez por Kerr *et al.* (1972),

designa forma fisiológica de morte celular que ocorre segundo programa genético que desencadeia processo de autodigestão controlada, em consonância com a remoção de células lesadas, senescentes ou imprestáveis, sem alteração do microambiente celular (PAROLIN e REASON, 2001).

Além de seu papel fisiológico de regulação da população celular, controla os processos de desenvolvimento, morfogênese, limita as reações imunes e representa importante mecanismo fisiopatológico de lesão tecidual, estando sua desregulação envolvida com muitas doenças autoimunes, o câncer e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

Observadas pelo “lado de fora”, as células sofrendo esse tipo de morte tornam-se arredondadas e se retraem do contato com as células vizinhas, semelhante ao que acontece com as células sofrendo mitose. Seguido por um prolongado período de formação de “bolhas” citoplasmáticas (*blebbing*) que freqüentemente são liberadas formando pequenas vesículas citoplasmáticas que são chamadas de corpos apoptóticos (Figura 1). Os corpos apoptóticos e as células sofrendo MCP são prontamente reconhecidos como sendo inviáveis e são digeridas por fagócitos para a reciclagem de seus componentes (TAYLOR *et al.*, 2008).

Figura 1. Características da morte celular programada por apoptose em comparação com a morte por necrose (extraído e adaptado de GEWIES, 2003).

Do “lado de dentro”, ou bioquimicamente, são observadas a externalização da fosfatidilserina (FS), um fosfolípido de membrana (MARTIN *et al.*, 1995), clivagem proteolítica de um número variado de substratos por proteases denominadas de caspases (MARTIN e GREEN, 1995) e a condensação nuclear seguida pela hidrólise internucleossomal do DNA formando fragmentos múltiplos de 200 pares de base (ZIMMERMAN *et al.*, 2001). As redes do complexo de Golgi, do retículo endoplasmático e das mitocôndrias sofrem uma fragmentação relevante para o processo pelo fato que o comprometimento da mitocôndria, por exemplo, leva a liberação da proteína intermembrana chamada citocromo C que por sua vez é responsável pela montagem do complexo ativador de caspases chamado de apoptossomo (TAYLOR *et al.*, 2008).

Os resíduos de FS residem constitutivamente na face interna da membrana plasmática e são rapidamente externalizados para a face externa da membrana em resposta a aumentos do Ca^{2+} intracelular, injúria celular ou agentes indutores de MCP (MARTIN *et al.*, 1995). A externalização da FS é um evento relativamente inicial na MCP e ocorre antes de a membrana celular ter sua permeabilidade comprometida, servindo como um marcador para o reconhecimento das células em processo de MCP por macrófagos, permitindo então a eliminação das células mortas antes que ocorra a permeabilização da membrana, liberação de componentes do citoplasma e o dano tecidual (BRUMATTI *et al.*, 2008).

Um método muito utilizado na detecção da MCP é a utilização da Anexina V, uma proteína que se liga eficientemente a FS externalizada de maneira reversível e dependente de Ca^{2+} , combinada com moléculas fluorescentes (MARTIN, *et al.*, 1995; BRUMATTI *et al.*, 2008).

As caspases são proteases cisteína-dependentes aspartato-específicas que como o próprio nome diz, clivam seus substratos após um resíduo de aspartato. Essas proteínas existem normalmente no interior das células como enzimas precursoras (zimógenos) com pouca ou nenhuma atividade proteolítica. Entretanto após o estímulo que desencadeia a MCP,

que pode ocorrer por duas vias distintas, as caspases são ativadas iniciando assim sua cascata (GEWIES, 2003).

O processo de MCP pode ser deflagrado pela “via intrínseca”, em função de estímulos internos de estresse intracelular como perturbações do ciclo celular e vias metabólicas, ou pela “via extrínseca” mediante estímulos externos que ativam receptores específicos na superfície celular chamados “receptores de morte” (PAROLIN e REASON, 2001; Figura 2).

Figura 2. Ilustração das duas principais vias de indução da MCP. Na via extrínseca (A), depois da ligação do ligante ao receptor de morte celular trimérico, este último recruta moléculas adaptadoras via seus domínios de morte intracelulares (DD) que além de possuírem os domínios DD possuem domínios efetores de morte celular (DED), os quais por sua vez, recrutam a pro-caspase-8 para o complexo que então se ativa por clivagem autoproteolítica e forma a caspase-8 ativa, ativando na sequência, as caspases efetoras para a execução da MCP. Na via intrínseca (B), diferentes estímulos apoptóticos estimulam a liberação do citocromo C que induz a formação de uma estrutura heptamérica em forma de cata-vento, o apoptossomo. As moléculas de pro-Caspase-9 se ligam ao cerne do apoptossomo e são ativadas por dimerização. Os dímeros de Caspase-9 ativa estimulam a ativação das caspases efetoras (extraído e adaptado de GEWIES, 2003).

Independentemente da via pela qual a célula sofre a morte celular programada, ela pode ser dividida em três fases. Na primeira fase, a fase de ativação, os sinais de morte são recebidos pela célula e são levados até o

controle central da maquinaria de morte ativando-a. Em seguida começa a fase de execução, na qual a maquinaria, já ativada, age sobre diversos alvos celulares e finalmente a fase de destruição onde célula é morta (MIGNOTTE e VAYSSIERE, 1998).

1.5) Via intrínseca da morte celular programada.

Resumidamente, a via “intrínseca” da MCP ocorre pela exposição da célula a situações de estresse como radiações, drogas, agentes oxidantes ou ainda sua privação de fatores essenciais de sobrevivência. Estes estímulos promovem um desbalanço das proteínas reguladoras da MCP existentes no citosol, as proteínas pró- e anti-apoptóticas sendo as proteínas membros da família do Bcl-2 as mais bem estudadas, que irão interagir entre si e promoverão a liberação de proteínas mitocondriais em especial o citocromo c (Cito-c). O Cito-c interage no citoplasma com o fator apoptótico ativador de protease-1 (Apaf-1), pró-Caspase-9 e ATP formando um complexo chamado de apoptossomo que ativa a Caspase-9 (uma caspase iniciadora) que por sua vez ativa a caspase-3 (caspase efetora) que executa então a MCP da célula (THORBURN, 2004).

Diversos estudos têm demonstrado a ocorrência espontânea ou experimentalmente induzida de MCP através desta via, em células germinativas primordiais e oócitos (MORITA e TILLY, 1999; YANG e RAJAMANHENDRAM, 2002; ROTH e HANSEN, 2004) e em vários estádios do desenvolvimento embrionário pré-implantacional em mamíferos (JURISICOVA e ACTON, 2004).

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E ESTABELECIMENTO DE PRENHEZES MEDIANTE O USO DE FIBROBLASTOS BOVINOS EM PROCESSO DE MCP COMO DOADORES DE NÚCLEOS NA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

Resumo

MIRANDA, M.S. **Desenvolvimento embrionário e estabelecimento de prenhez mediante o uso de fibroblastos bovinos em processo de MCP como doadores de núcleos na técnica de transferência nuclear.** Tese de Doutorado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

Diversos tipos celulares nas mais variadas condições têm sido usados como doadores de núcleo para a TNS. Ainda não está claro se o estado fisiológico destas células afeta o posterior desenvolvimento dos embriões. Neste trabalho, testou-se a hipótese que fibroblastos bovinos em processo de MCP podem ser reprogramados na transferência nuclear. Fibroblastos foram cultivados até atingirem 60% de confluência, sincronizados por restrição de soro durante 24h e em seguida a MCP foi analisada por citometria de fluxo com a técnica da Anexina V/Iodeto de propídeo. Células Anexina positivas (MCP) e Anexina-negativas (Vivas) foram separadas por citometria de fluxo e utilizadas para a TNS. Células não coradas e não separadas no citômetro serviram como controle (Controle). Os embriões reconstruídos foram avaliados quanto à fusão, clivagem (2º dia de cultivo), blastocisto (7º dia) e prenhez (D30, D60 e nascimento). O índice de MCP dos blastocistos obtidos foi determinado. Os resultados foram analisados pela ANOVA ou teste de χ^2 com nível de significância de 5%. Não houve efeito nas taxas de fusão ($p>0,05$). Embriões reconstruídos com células MCP tiveram menor taxa de clivagem e formação de blastocistos (72,7% e 18,8%, respectivamente) em comparação ao grupo reconstruído com células Vivas (83,4% e 34,7%, respectivamente; $p<0,05$), não diferindo dos embriões Controle (77,3% e 27,3%, respectivamente; $p>0,05$). O índice de MCP do grupo de embriões MCP foi similar aos índices dos embriões clonados a partir de células Vivas e Controle ($p>0,05$). Após a transferência para receptoras, os grupos MCP, Vivas e Controle não diferiram com relação à taxa de prenhez aos 30d (18,1%, 13,3% e 27,5%, respectivamente; $p>0,05$). Entretanto aos 60d, a perda gestacional no grupo MCP (25%) foi inferior a do grupo Vivas (100%) e Controle (62,5%). Somente um nascimento, do grupo MCP (4,5% dos embriões transferidos), foi obtido no experimento. Conclui-se que células em processo de MCP, podem ser reprogramadas quando utilizadas como doadoras de núcleo na técnica de transferência nuclear, podendo estabelecer gestações e nascimentos, entretanto houve um efeito prejudicial nas taxas de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto assim como houve aumento do índice de MCP nos embriões reconstruídos.

Palavras-chaves: transferência de núcleo, MCP, separação celular.

Abstract

MIRANDA, M.S. Embryonic development and pregnancy rates by the use of bovine fibroblasts in programmed cell death (PCD) as nuclear donors in the nuclear transfer (NT) technology.

PhD. Thesis – Animal Science and Food Engineering Faculty, University of Sao Paulo, Pirassununga, 2009.

It is not clear if the physiological status of the cells can affect further embryonic development in NT. We hypothesized that adult bovine fibroblasts in PCD can be reprogrammed when used as nuclear donors for cloning. Fibroblasts were cultivated until 60% confluency, synchronized by serum starvation for 24 h and stained with Annexin V and Propidium iodide (PI) by flow cytometry. Annexin positive cells (PCD cells) and Annexin negative cells (Live cells) were sorted and used for NT. Unsorted, unstained cells were used as control (Control cells). After reconstruction, fusion, cleavage (day 2 of culture), blastocyst (day 7) and pregnancy rates (day 30, 60 and birth) were recorded. Apoptotic index of the embryos was determined by TUNEL. Data were analyzed with ANOVA and Chi-square test with 5% of significance level. There was no effect on fusion rates ($p>0.05$). Embryos reconstructed with PCD cells had lower cleavage and blastocyst rates (72.7 and 18.8%, respectively) compared with embryos reconstructed with Live cells (83.4 and 34.7%, respectively; $p<0.05$). Apoptotic index in embryos produced from cells in PCD was similar compared to embryos produced from Live and Control cells ($p>0.05$). Pregnancy rates were similar between cloned groups on day 30 after embryo transfer ($p>0.05$). However it was observed a reduced pregnancy loss in PCD group on day 60 (25%) compared with Control (62.5%) and Live (100%) groups. Only one calf, from PCD cells (4.5% of the transferred embryos), has been obtained in this experiment. In conclusion, it was showed that cells in PCD process can be reprogrammed when used as nuclear donors after NT producing even live animals. However, a negative effect on embryonic development and an increase in the apoptotic index of these embryos was observed.

Key-words: nuclear transfer, PCD, cell sorting.

1) Introdução

Nos últimos 10 anos desde o nascimento da ovelha Dolly gerada a partir de uma célula diferenciada da glândula mamária (WILMUT *et al* 1997), animais clonados de células somáticas já foram gerados em pelo menos 20 espécies diferentes e o número e publicações sobre transferência nuclear cresce a cada ano (OBACK e WELLS, 2007; Figura 3). Uma estimativa de 2005 sugere que até o ano de 2004, cerca de 1.500 bezerros foram obtidos pelo uso desta técnica no mundo, principalmente na América do Norte, Japão, Nova Zelândia e Europa, assim como em países da América do Sul e Ásia (HEYMAN, 2005).

Figura 3. Número crescente de publicações sobre a TNS ao longo do tempo por grupo de espécies. Foram incluídas somente publicações *peer-reviewed* listadas no PubMed. Na categoria "não especificado", estão incluídos artigos que não mencionam uma espécie em particular (revisões gerais, por exemplo). "Outras" representam as outras espécies nas quais a TNS vem sendo estudada. (Extraído e adaptado de OBACK e WELLS, 2007).

Apesar desta lista continuamente crescente de animais clonados, a TNS continua sendo um processo ineficiente. Tipicamente, a eficiência da TNS medida como a proporção de proles viáveis em função do número de embriões clonados transferidos para receptoras, gira em torno de 1-5%

(HEYMANN, 2005) sendo muito baixa quando comparadas com outras biotecnologias como a fertilização *in vitro*, o que indica um claro efeito da dificuldade de reprogramação nuclear (Figura 4).

Figura 4. Eficiência do desenvolvimento de blastocistos e desenvolvimento embrionário a termos em camundongos e bovinos. (A) Percentual de desenvolvimento de embriões derivados de fertilização *in vitro* (IVF) e TNS (NT) nas duas espécies. (B) Percentual de sobrevivência, a termo, após a transferência de embriões fertilizados *in vitro* (IVF) e clonados (NT) nas duas espécies. (Retirado e adaptado de YANG *et al.*, 2007).

Mesmo com a baixa eficiência, várias aplicações têm sido empregadas para a técnica como, por exemplo, (1) gerar indivíduos idênticos para os mais diversos fins, a chamada TNS reprodutiva (WELLS *et al.*, 1998; LANZA *et al.*, 2000; KUBOTA *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2000; ENRIGHT *et al.*, 2002; MEIRELLES *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2005;), (2) gerar animais geneticamente modificados também com propósitos comerciais, terapêuticos e zootécnicos (SCHINEKE *et al.*, 1997; CIBBELI *et al.*, 1998; DENNING *et al.*, 2001; BROPHY *et al.*, 2003; WALL *et al.*, 2005; LAI *et al.*, 2006); 2), (3) mais recentemente como um meio de produzir células tronco embrionárias para o uso em terapias celulares (CHANG *et al.*, 2003; BYRNE *et al.*, 2007; JU *et al.*, 2007) e (4) como modelo para o entendimento de vários aspectos associados à técnica de TNS, tanto ao nível molecular ou celular como a questão do tamanho dos telômeros (LANZA *et al.*, 2000; BETTS *et al.*,

2001), a herança mitocondrial (MEIRELLES, *et al.*, 2001; HIENDLEDER *et al.*, 2003 e 2005; FERREIRA *et al.*, 2007), remodelagem da cromatina e reprogramação epigenética (BORDIGNON *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2003; DEAN *et al.*, 2003; MORGAN *et al.*, 2005; SUTEEVUN *et al.*, 2006) e a inativação do cromossomo X (XUE *et al.*, 2002; OKAMOTO *et al.*, 2005; MERIGHE, 2007).

Diversos fatores podem estar envolvidos na baixa eficiência do processo de TNS animal. Como por exemplo, o próprio procedimento técnico em si (MACHATY *et al.*, 1999; GALLI *et al.*, 2002), a assincronia do ciclo celular entre célula doadora e o oócito receptor (CAMPBELL *et al.*, 1996a), anomalias epigenéticas e cromossomais da célula doadora (GIRALDO *et al.*, 2007) e padrão de expressão gênica embrionária alterada (WRENZYCKI *et al.*, 2001).

O processo de MCP também pode estar envolvido na baixa eficiência da técnica de TNS animal. As características clássicas da MCP são a exposição da FS na membrana plasmática, ativação das caspases, liberação do citocromo C, condensação da cromatina e fragmentação citoplasmática e do DNA (KERR, 2002).

A análise da MCP embrionária mediante a técnica de identificação de núcleos com DNA fragmentado (TUNEL - *terminal deoxynucleotidyl transferase nick-end labeling*) mostra que culturas inadequadas aumentam a incidência de MCP nos embriões e que isso pode diminuir as taxas de implantação embrionária, aumentar a reabsorção fetal e reduzir o peso fetal ao nascimento em camundongos (WUU *et al.*, 1999). Sabe-se também que a ocorrência de MCP em embriões produzidos *in vitro* é maior que nos embriões produzidos *in vivo*, tanto em camundongos (BRISON e SCHULTZ, 1997) quanto em bovinos (GJORRET *et al.*, 2003). Além disso, sabe-se que embriões clonados possuem maiores taxas de MCP do que os fecundados *in vitro* em bovinos (FAHRUDIN *et al.*, 2002), suínos (HAO *et al.*, 2003) e coelhos (LIU *et al.*, 2005).

Pouco é conhecido a respeito dos efeitos oriundos das células somáticas (i.e diferentes protocolos de sincronização, tipos celulares, repiques celulares, etc.) utilizadas na técnica de TNS animal, sobre a ocorrência da MCP nos embriões clones produzidos.

Um estudo de Jang *et al.* (2004) avaliou o efeito prejudicial da idade da célula doadora de núcleo (repiques) sobre a MCP dos embriões reconstruídos. Park *et al.* (2004) reportaram que o tratamento das células doadoras com inibidores de MCP melhorou a qualidade dos embriões clonados que foram produzidos. Liu *et al.* (2005) mostraram que embriões de coelho clonados a partir de células do *cumulus oophorus* apresentaram uma menor taxa de MCP em comparação aos clonados a partir de fibroblastos.

Neste experimento, foi proposto o uso de fibroblastos bovinos em processo de MCP como doadores de núcleo no processo de transferência nuclear e o efeito do uso destas células na ocorrência da MCP nos embriões clones produzidos.

2) Hipótese Experimental

Fibroblastos bovinos, em processo de morte celular programada, podem ser reprogramados quando utilizados como doadores de núcleo na técnica de transferência nuclear, porém influenciam negativamente no desenvolvimento in vitro dos embriões clones.

3) Objetivos

3.1) Geral

Avaliar se fibroblastos bovinos, em processo de morte celular programada, são capazes de gerar embriões e prenhezese quando utilizados como doadores de núcleo na técnica de transferência nuclear.

3.2) Específicos

3.2.1) Nas células Somáticas

1) Determinar um protocolo de sincronização do ciclo celular dos fibroblastos para a sua utilização na técnica de transferência nuclear.

2) Verificar a taxa de ocorrência de MCP em fibroblastos bovinos utilizando a citometria de fluxo e o ensaio da Anexina V / Iodeto de Propídeo.

3) Utilizando a técnica de *Fluorescent Activated Cell Sorting* (FACS) separar células em processo de MCP e utilizá-las como doadoras de núcleo na técnica de TNS.

3.2.2) Nos Embriões Reconstituídos

1) Analisar as taxas de fusão, clivagem e posterior desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto dos embriões produzidos com fibroblastos em processo de MCP.

2) Verificar o número total de células e a ocorrência da MCP nos blastômeros dos embriões clones produzidos mediante a técnica de TUNEL.

3) Verificar o potencial dos embriões reconstruídos com células em processo de MCP, em estabelecer gestações a termo após a sua transferência para receptoras sincronizadas.

4) Material e Métodos

4.1) Obtenção e Manutenção das Culturas de Fibroblastos

As células somáticas doadoras de núcleo foram obtidas a partir de biópsias realizadas de fêmea adulta. A biópsia foi retirada da prega da cauda do animal e transportada imediatamente para o laboratório em solução tampão fosfato (PBS) em gelo. O tecido foi então triturado em pequenos pedaços de aproximadamente um mm, lavados em PBS e colocados em uma placa de Petri de 35 mm de diâmetro. O cultivo procedeu-se em meio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium* – GIBCO) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), piruvato (22 µg/mL), glutamina (1 mM) e gentamicina (50 µg/mL). A incubação foi realizada a uma temperatura de 38,5°C e atmosfera gasosa de 5% CO₂ em ar, trocando-se o meio a cada três dias.

Após o crescimento das primeiras células, o meio foi substituído por DMEM suplementado com 10% de SFB e o cultivo processado até a 3ª passagem, momento no qual as células foram criopreservadas em nitrogênio líquido em meio DMEM suplementado com 20% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Durante a realização dos experimentos, amostras de células foram descongeladas mantidas em DMEM com 10% de SFB até o momento da utilização nos experimentos. Foram utilizadas nos experimentos células entre a 4ª e a 10ª passagens.

4.2) Determinação do Protocolo de Sincronização do Ciclo Celular

Foram avaliadas duas abordagens metodológicas para a sincronização do ciclo celular, (1) confluência celular aliada à redução de SFB (*serum starvation*) por 3 dias e (2) plaqueamento com 60% de confluência, sincronização pela privação de SFB por 24h ou 72h e avaliação do ciclo celular.

Na primeira abordagem, portanto, os fibroblastos foram cultivados em DMEM com 10% de SFB em garrafas de cultivo de 25cm² até atingirem 100% de confluência quando então o meio de cultivo foi substituído pelo DMEM com 0,5% de SFB. As culturas foram mantidas nessa condição por 72h e após este período, as células foram tripsinizadas e analisadas por citometria de fluxo.

Para a segunda abordagem, fibroblastos oriundos de culturas não confluentes, foram plaqueados (3×10^4 células/mL) em garrafas de 25cm² em 3 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB. Vinte e quatro horas depois, quando a cultura estava com aproximadamente 60% de confluência, o meio foi substituído por DMEM suplementado com 0,5% de SFB no qual as culturas permaneceram por 24 ou 72h. Em seguida as células foram tripsinizadas e o ciclo celular foi analisado.

Após os tratamentos as culturas foram tripsinizadas e foi realizada a análise de ciclo celular de acordo como descrito anteriormente. A descrição das estratégias avaliadas está ilustrada na Figura 5.

<p>✓ ESTRATÉGIA I:</p> <p>confluência celular mais privação de SFB (0,5%) por 3 dias → avaliação do ciclo celular</p>
<p>✓ ESTRATÉGIA II:</p> <p>plaqueamento 60% confluência → privação de SFB (0,5%) por 1 ou 3 dias → avaliação do ciclo celular. Objetivo: praticidade</p>

Figura 5. Resumo da seqüência de procedimentos utilizados em cada uma das duas estratégias utilizadas para a sincronização do ciclo celular dos fibroblastos.

A citometria foi realizada de acordo com o protocolo do Laboratório de Bioenergética da UNICAMP. As células foram tripsinizadas, fixadas em etanol 70% gelado e mantidas a -20 °C por no máximo uma semana, coradas por meia hora com iodeto de propídeo (10 µg/mL) e analisadas 10.000 células em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience). Os percentuais de células em cada fase do ciclo celular foram obtidos dos histogramas utilizando-se o programa ModFit.

4.3) Determinação da MCP nos fibroblastos

Após o período de sincronização do ciclo celular, a MCP foi analisada por citometria de fluxo FACS Aria (BD Bioscience) mediante a marcação da exposição da FS pelo ensaio da Anexina V (Apoptest-FITC; Nexins Research, Hoeven, Holanda). Para tanto, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em tampão de ligação (fornecido no kit) contendo Anexina V (10 µg/mL) por 15 minutos protegidas da luz. Após a coloração com a Anexina, as células foram coradas com iodeto de propídeo (1 µg/mL) e imediatamente analisadas por citometria de fluxo. Na Figura 6, está contida a ilustração que descreve o ensaio da Anexina V / iodeto de propídeo para a detecção da MCP.

Figura 6. Ilustração do ensaio da Anexina V/ iodeto de propídeo. São geradas quatro possibilidades no ensaio. (A) Na célula viva não há nenhuma marcação; (B) Na célula em MCP ocorre apenas a exposição da FS na face externa da membrana plasmática e marcação com a Anexina V conjugada com um fluorocromo (FITC no exemplo acima); (C) Na célula em MCP tardia, além da exposição da FS com marcação pela Anexina a membrana plasmática celular sofre colapso e se torna permeável ao iodeto de propídeo fazendo com que a célula possua uma dupla marcação (Anexina V e iodeto de propídeo); (D) Na célula em processo de necrose, ocorre somente a permeabilização da membrana plasmática com a conseqüente marcação pelo iodeto de propídeo, não havendo a externalização da FS.

Foram avaliadas 5.000 células por amostra em cada repetição. Foi calculada pelo citômetro a distribuição percentual das quatro categorias de células: células em processo de MCP (marcadas somente com a Anexina), vivas (com nenhuma marcação), necróticas (marcação somente para iodeto de propídeo) e em processo de MCP tardio (marcadas tanto para a Anexina quanto para o iodeto de propídeo). Um grupo de células não coradas foi utilizado para o ajuste da fluorescência basal (*background*).

4.4) Produção dos Embriões Clonados

4.4.1) Maturação *in vitro* dos oócitos bovinos

Ovários de vacas zebus ou mestiças foram obtidos em abatedouro, transportados em solução salina (0,9%) a 37°C, e encaminhados até o laboratório. Os complexos *cumulus*-oócito foram aspirados de folículos entre 2 a 8 mm utilizando uma seringa de 10 mL acoplada a uma agulha de 18 G, e somente os oócitos de qualidade I, com *cumulus* compacto completo e citoplasma límpido e de aspecto homogêneo (finas granulações), foram selecionados para os experimentos. Os oócitos foram, em seguida, maturados em TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃ suplementado com 10% de SFB, piruvato (22 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), 0,5 µg de FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1 µg de estradiol/mL em microgotas de 100 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral (15 oócitos/gota). A incubação foi realizada a uma temperatura de 38,5°C e atmosfera gasosa de 5% CO₂ em ar, durante 18 h.

4.4.2) Transferência nuclear – Seleção do corpúsculo polar e enucleação dos oócitos.

Após 18h do início da maturação, as células do *cumulus* foram removidas por exposição à solução de hialuronidase (2 mg/mL) em PBS simples acrescido de 0,4% de BSA e os oócitos foram selecionados pela presença do 1º corpúsculo polar. Em seguida, foram transferidos para uma solução de citocalasina B (7,5 µg/mL) e Hoechst 33342 (10 µg/mL) em meio SOF (VAJTA *et al.*, 1999) suplementado com 2,5% de SFB e 0,5% de albumina sérica bovina BSA durante 15 minutos.

Após a seleção e coloração, os oócitos foram transferidos para a gota de micromanipulação com meio HEPES-SOF (WELLS *et al.*, 1999) suplementado com 7,5 µg/mL de citocalasina B sob microscópio invertido

(Leica - Germany) equipado com sistema de luz ultravioleta. Os oócitos foram então enucleados, removendo uma pequena porção do citoplasma próxima à região do 1º corpúsculo polar (eliminação do material genético do oócito). Esta porção aspirada foi visualizada sob luz ultravioleta para confirmação da enucleação. Após a enucleação, todos os oócitos foram recolocados em meio SOF e retornaram para a estufa de cultivo.

4.4.3) Transferência nuclear – Separações celulares (cell sorting) e reconstrução embrionária com as células em processo de MCP.

Após a enucleação de todos os oócitos, os fibroblastos previamente sincronizados, foram tripsinizados, corados e analisados no citômetro quanto à ocorrência da MCP (marcação pela Anexina V). Em seguida, foi realizada a separação citométrica das populações celulares (FACS - *fluorescent activated cell sorting*) de acordo com o padrão de marcação da Anexina V (Figura 7).

Figura 7. (A) Foto do citômetro de fluxo (BD FACS Aria) utilizado nos experimentos. (B) dot plot mostrando o padrão da observação das células analisadas por citometria de fluxo, com os quadrantes mostrando as categorias de células de acordo com a marcação com a Anexina V e com o iodeto de propídeo. As setas indicam as populações celulares separadas (cell sorting) que foram utilizadas na TNS.

Foram preparados tubos de 15 mL com DMEM suplementado com 0,5% de SFB e foram separadas as populações de células (1) Anexina positivas - iodeto de propídeo negativas e (2) Anexina negativas - iodeto de propídeo negativas, sendo 3.000 células de cada.

Após a separação, as células foram centrifugadas e transferidas para a gota de micromanipulação juntamente com os oócitos previamente enucleados. Uma única célula foi então inserida espaço perivitelíneo de cada um dos oócitos perfazendo dois grupos experimentais de embriões reconstruídos: com células Anexina V positivas (grupo MCP) e com células Anexina V negativas (grupo Vivas). Uma alíquota de células, oriunda das que foram coradas e analisadas, foi separada sendo então utilizada para a reconstrução dos embriões do terceiro grupo experimental (grupo Controle). A etapa da transferência das células somáticas dos três grupos experimentais não ultrapassou o tempo total de 1h.

Os conjuntos oócitos-células somáticas foram eletricamente fundidos (Electroporator – Eppendorf) 24 h após o início da maturação em uma solução contendo 0,3 M de manitol, 0,1 mM $MgSO_4$, 0,5 mM Hepes e 0,05% BSA. Os embriões reconstruídos foram alinhados manualmente de maneira que a superfície de contato entre o oócito e a célula estava paralela aos eletrodos (200 μ M de distância) da câmara de fusão (Eppendorf). As células foram, então, expostas a dois pulsos elétricos de 2,25 kV/cm durante 45 μ seg. Aproximadamente 1,5 h após a eletrofusão (completando 26 h após o início da maturação), a taxa de fusão foi avaliada e os oócitos fundidos foram quimicamente ativados em 5 μ M de Ionomicina durante 5 minutos e, em seguida, cultivados em meio SOF com 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6DMAP) durante 3h.

Ao término do período de ativação, os oócitos foram cultivados em meio SOF suplementado com 2,5% de SFB, 0,5% de BSA e co-cultivo com células da granulosa da maturação. O cultivo foi em estufa com temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% CO_2 , em ar, durante sete dias. No

segundo dia de cultivo, os embriões foram retirados para a análise da taxa de clivagem e no sétimo dia de cultivo foram reavaliados quanto à taxa de formação de blastocistos sendo parte dos embriões obtidos fixados em paraformaldeído 3,7% para contagem do número de células total e taxa de MCP e parte transferidos para receptoras sincronizadas.

4.5) Análise da MCP nos embriões clones

Os embriões destinados para a análise da taxa de MCP foram fixados no sétimo dia de cultivo em paraformaldeído 3,7% em PBS e armazenados a 4°C até o momento da análise. Para a análise, os embriões foram lavados quatro vezes em PBS contendo 3 mg/mL de álcool polivinílico (PBS-PVA), permeabilizados em PBS contendo 0,1% (v/v) de Triton X-100 por 1h. Em seguida lavados três vezes em PBS-PVA e incubados com as dUTPs conjugadas com fluoresceína e com a enzima TdT (reagentes do kit TUNEL; Roche Diagnostics, Tokio) por 1h a 37°C. Controles positivos (um ou dois embriões) foram incubados com 1000 UI/mL de desoxiribonuclease (DNase I; Sigma) por 1h a 37°C e lavados três vezes em PBS-PVA. Controles negativos (um a dois embriões) foram incubados por 1h com as dUTPs conjugadas com a fluoresceína, na ausência da enzima TdT. Após a reação de TUNEL os embriões foram corados com Hoechst (5 µg/mL) para a visualização dos núcleos embrionários (em azul). Os embriões foram montados entre lamina e lamínula e analisados em microscópio de fluorescência, sendo que os núcleos que apresentaram a coloração verde foram considerados apoptóticos.

O índice de MCP foi calculado dividindo-se o número de núcleos positivos pelo número total de células de cada embrião.

4.6) Produção dos embriões partenogenéticos.

Em todos os experimentos onde foram produzidos os embriões clones, foram também produzidos embriões partenogenéticos que serviram como controle da qualidade do processo de ativação e das condições de cultivo *in vitro*. Para tanto, em cada repetição, um grupo de oócitos não micromanipulados foram ativados em 5 μ M de Ionomicina durante 4 minutos e, em seguida, cultivados em meio SOF com 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6DMAP) durante 3h. Após a ativação os embriões foram cultivados em meio SOF e avaliados de acordo como descrito para os embriões clonados.

4.7) Transferência embrionária para receptoras sincronizadas e diagnóstico das gestações.

Alguns dos embriões que atingiram o estágio de blastocisto no sétimo dia de cultivo foram envasados em meio SOF em palhetas de 0,25 mL e transportados até a fazenda, onde foram inovulados em fêmeas bovinas cujo estro foi sincronizado pela injeção de 150 μ g de um análogo de prostaglandina F2a (D cloprostenol, Preloban, Intervet).

Aos trinta dias de gestação o diagnóstico de gestação foi realizado por exame ultrassonográfico por via trans retal com aparelho Aloka SSD-900 (Aloka Co., Tóquio, Japão) equipado com transdutor linear de 5MHz. O acompanhamento das gestações estabelecidas foi feito mediante uma segunda ultrassonografia no 60º dia de gestação. A partir dos 90 dias de gestação a ocorrência de aborto foi monitorada até o momento do parto.

4.8) Análise Estatística

Para dados referentes às clonagens e os resultados de prenhez, foi utilizado o teste do X^2 .

A ANOVA foi utilizada para a análise dos dados referentes às citometrias (transformados para Arco-Seno), número de células total embrionário e índice de MCP (número de blastômeros TUNEL-positivos dividido pelo número de células total), utilizando-se o pós-teste de Bonferroni quando necessário.

O nível de significância adotado foi de 5%, sendo o nível de significância de 10% adotado somente quando mencionado. Todas as análises foram realizadas utilizando o software BioEstat 4.0 (AYRES *et al.*, 2005).

5) Resultados

5.1) Determinação do protocolo de sincronização do ciclo celular

A primeira abordagem do protocolo de sincronização (confluência e restrição de soro por três dias) foi eficiente em sincronizar os fibroblastos na fase G1 (84,1% das células) como mostrado na (Figura 9).

Com relação à abordagem de sincronização de culturas de células com aproximadamente 60% de confluência (Figura 8) pelo uso da restrição de soro, pôde-se observar que 24h de restrição, foram suficientes para sincronizar, em média, 84,1% dos fibroblastos em fase G1 do ciclo celular (Figura 9), não havendo diferença se o tempo de privação foi prolongado por mais dois dias estando às células em confluência ou não ($p>0,05$).

Portanto, o protocolo de sincronização do ciclo celular pela restrição de soro por 24h foi escolhido para ser utilizado em todos os experimentos.

Figura 8. Fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* com aproximadamente 60% de confluência (100X).

Figura 9. Resultado das análises do ciclo celular de fibroblastos bovinos sincronizados pela restrição de soro. Mesmo em culturas com 60% de confluência, 24h de restrição de SFB foram suficientes para sincronizar a maioria das células em fase G1/G0 do ciclo celular, não diferindo dos resultados obtidos com 48h a mais de restrição de SFB tanto com 60% de confluência (72h Restrição) quanto em confluência (Conf./Restr. 72h); (Ciclando) Culturas em crescimento (60% de confluência) não sincronizadas (Conf./Restr. 72h); Culturas confluentes sincronizadas pela restrição de soro (0,5%) por 72h; (24 Restrição) culturas com 60% de confluência sincronizadas pela restrição de soro por 24h; (72h Restrição) culturas com 60% de confluência sincronizadas pela restrição de soro por 72h. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

5.2) Análise da ocorrência de MCP em fibroblastos bovinos.

A análise citométrica da taxa de MCP nos fibroblastos com 60% de confluência e sincronizados com 24h de restrição foi repetida três vezes sendo que em cada repetição 5.000 células foram analisadas. Os resultados estão mostrados nas Figuras 10 e 11.

Foi observado que, na média 15% das células estavam em processo de MCP, as células Vivas perfizeram 79,7%, as células em necrose 3,6% e as células em MCP tardia perfizeram 1,5% (Figura 11).

Figura 10. *Dotplot* gerado pelo citômetro de fluxo no qual é mostrado o padrão de leitura da marcação das células pela Anexina V (eixo X) e iodeto de propídeo (eixo Y) e os respectivos quadrantes gerados. (A) *dot plot* de células não coradas. Esta análise serviu para o ajuste dos quadrantes a partir da fluorescência basal emitida pelas células (background) para os dois corantes analisados; (B) *Dot plot* da análise das células coradas com a Anexina V e o iodeto de propídeo. Os valores de cada sub população presente em cada um dos quadrantes é calculado pelo equipamento em valores percentuais. Notar que nesta amostra a taxa de MCP foi de 11,0%.

Figura 11. Valores médios das taxas de MCP, Necrose e MCP tardia analisadas em culturas de fibroblastos em regime de restrição de SFB por 24h. A taxa média de MCP obtida foi de 15,1%.

5.3) Produção dos embriões clonados

Neste experimento foi utilizado um total de 935 oócitos, sendo 765 micromanipulados (presença do primeiro corpúsculo polar) e 170 ativados partenogeneticamente. Os resultados estão mostrados na Tabela 1.

Observou-se que não houve efeito do uso de células em processo de MCP sobre a fusão aos oócitos encucleados, uma vez que não houve diferença entre os grupos MCP, Vivas e Controle (67,9%, 74,5% e 65,4%, respectivamente; $p > 0,05$).

Com relação à clivagem embrionária, foi observada influência do *status* fisiológico da célula doadora antes da TNS. Os embriões reconstruídos com células em processo de MCP tiveram taxas reduzidas de clivagem (72,7%) em comparação ao grupo reconstruído com células Vivas (83,4%; $p < 0,05$) e em comparação ao grupo Partenogenético (78,2%; $p < 0,05$), não diferindo, no entanto, do grupo Controle (77,3%; $p > 0,05$). Vale salientar que a

reconstrução dos embriões com células Vivas, rendeu resultados até mesmo superiores ao do grupo de embriões Partenogenéticos (83,4% vs 78,2%; $p < 0,05$).

Tabela 1. Resultados do experimento de TNS com fibroblastos adultos, não tratados com STP, separados por citometria de fluxo com relação à marcação com a Anexina V.

Células	Nº	Nº Fundidos (%)	Nº Clivados (%)¹	Nº Blastocistos (%)¹
	Oócitos			
MCP	243	165 (67,9)	120 (72,7) ^a	31 (18,8) ^a
Vivas	259	193 (74,5)	161 (83,4) ^b	67 (34,7) ^b
Controle *	263	172 (65,4)	133 (77,3) ^a	47 (27,3) ^a
Partenogênese	170	-	133 (78,2) ^c	90 (52,9) ^c

¹Valor percentual calculado sobre o número de fundidos * Fibroblastos não corados e não separados no citômetro de fluxo. ^a, ^b Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (teste do X^2 , $p < 0,05$).

Resultado similar foi obtido no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, uma vez que os embriões reconstruídos com células em processo de MCP apresentaram taxas reduzidas de desenvolvimento (18,8%) em comparação ao grupo reconstruído com células Vivas (34,7%; $p < 0,05$) e em comparação ao grupo Partenogenético (52,9%; $p < 0,05$), não diferindo do grupo Controle (27,3%; $p > 0,05$).

Na Tabela 2, são mostrados os resultados da contagem do número de células total, percentual de células em MCP e do índice de MCP de blastocistos clonados a partir das diferentes categorias de células propostas.

Embriões reconstruídos a partir de células em MCP possuíram número total de blastômeros inferior ($63,2 \pm 10,7$) comparado com o grupo reconstruído a partir de células Controle ($114,6 \pm 37,2$; $p = 0,07$) e células Vivas ($105,6 \pm 41,1$; $p = 0,07$).

A utilização de células em MCP como doadoras de núcleo para a TNS não aumentou ($p>0,05$) o índice de MCP nos blastocistos produzidos ($0,06 \pm 0,06$) em comparação ao grupo Vivas ($0,04 \pm 0,02$) e o grupo Controle ($0,03 \pm 0,01$) (Figura 12).

Figura 12. Fotomicrografias de embriões clonados a partir de células Vivas (A) e em MCP (B), submetidos à técnica de TUNEL e fotografados em microscópio de fluorescência. Os núcleos TUNEL-positivos foram corados em verde (A'- B') e o Hoechst 33342 (10 μ g/mL) foi utilizado para coloração de todos os núcleos embrionários (A-B). Pontas de setas indicam exemplos de núcleos com o DNA fragmentado. Aumento de 200X.

Não foi observada redução do índice de MCP quando células Vivas foram utilizadas como doadoras de núcleo em comparação as células Controle ($p>0,05$).

Tabela 2. Resultados da contagem do número de células total, percentual de núcleos em MCP e do índice de MCP de embriões clonados a partir de fibroblastos adultos, não tratados com STP, separados por citometria de fluxo com relação à marcação com a Anexina V.¹

Células	Nº Embriões	Nº Total Células ²	Blastômeros TUNEL- positivos (%)	Índice de MCP
MCP	4	63,2 ± 10,7 ^a	5,9 ± 6,1	0,06 ± 0,06
Vivas	16	105,6 ± 41,1 ^b	4,1 ± 2,5	0,04 ± 0,02
Controle *	11	114,6 ± 37,2 ^b	3,4 ± 1,6	0,03 ± 0,01

¹Dados representam média±DP. * Fibroblastos não corados e não separados no citômetro de fluxo. ^a, ^b Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (ANOVA).²Nível de significância de 10%.

5.4) Resultados das taxas de prenhez.

Um total de 81 embriões foram transferidos dos três grupos experimentais, sendo 22 do grupo MCP, 30 do grupo Vivas e 29 do grupo Controle. Os dados são apresentados na Tabela 3 e Figura 13.

No primeiro diagnóstico de gestação realizado 30d após a transferência embrionária, não foi observada diferença entre os grupos MCP, Vivas e Controle (18,1%, 13,3% e 27,5%, respectivamente; $p>0,05$) sendo o grupo MCP o que apresentou numericamente a menor taxa de prenhez. No segundo diagnóstico, também não houve diferença entre a taxa de prenhez entre os grupos MCP e Controle (13,6% e 10,3%, respectivamente; $p>0,05$) sendo que no grupo Vivas houve perda de todas as prenhez presentes no primeiro diagnóstico.

Entre o segundo exame ultrassonográfico (D60) e o nascimento a ocorrência de abortos foi monitorada e observou-se uma perda de 62,5% das gestações no grupo Controle e de 25% no grupo MCP. Nenhum animal

chegou a termo nos grupos Controle e Vivas e um animal foi obtido no grupo MCP (4,5% dos embriões transferidos; Figura 14).

Tabela 3. Resultados das taxas de prenhez de embriões clonados a partir de fibroblastos adultos separados, por citometria de fluxo, com relação à ocorrência da MCP mediante o ensaio da marcação com a Anexina V.

	Nº Transf.	Prenhas D30 (%)	Prenhas D60 (%)	Abortos (%) ¹	Nascidos (%) ²
MCP	22	4 (18,1)	3 (13,6) ^a	2 (66,6)	1 (4,5)
Vivas	30	4 (13,3)	0 (0) ^b	-	-
Controle *	29	8 (27,5)	3 (10,3) ^a	3 (100)	0 (0)
Total Geral	81	16 (19,7)	6 (7,4)	5 (83,3)	1 (1,2)

* Fibroblastos não corados e não separados no citômetro de fluxo. ^{a, b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (teste do χ^2 , $p < 0,05$). ¹ Em relação ao número de prenhez no D60. ² Em relação ao número de transferências embrionárias.

Avaliando-se os resultados sob o ponto de vista de perdas gestacionais até o nascimento, ou seja, considerando-se o número de prenhez obtidas no D30 como 100%, observou-se que no segundo diagnóstico de gestação realizado no D60 de gestação houve no grupo MCP uma perda de somente 25% (uma gestação perdida de quatro iniciais; 1 de 4), no grupo Controle a perda foi de 62,5% (5 de 8) e no grupo Vivas essa perda foi de 100% (4 de 4).

Entre o segundo diagnóstico de gestação e o nascimento a taxa de aborto foi maior no grupo MCP (66,6%) em comparação ao grupo Controle (100 %), o que fez com que a taxa de manutenção da prenhez até o nascimento do grupo MCP tenha sido de 25%.

Figura 13. Resultados da taxa de prenhez (eixo Y direito) e de manutenção da prenhez (eixo Y esquerdo) de embriões clonados a partir de três categorias de células (Controle, MCP e Vivas) aos 30, 60d e nascimento. Os percentuais de prenhez foram calculados levando em consideração o número de transferências embrionárias de cada grupo e os valores de manutenção de prenhez foram calculados a partir do número de animais gestantes no exame ultrassonográfico de 30 d.

Figura 14. Bovino clonado a partir de uma célula em processo de MCP. A bezerra Nelore nasceu pesando 27 kg, porém teve parada cardíaca em menos de 24h de vida, por apresentar problemas cardio-respiratórios.

6) Discussão

O controle do estágio do ciclo celular na técnica de TNS é de fundamental importância para a manutenção da ploidia correta dos embriões reconstruídos. Quando oócitos enucleados em metáfase II são utilizados como receptores de núcleos, o ciclo celular da célula doadora deve ser sincronizado nas fases G0/G1 do ciclo celular (CAMPBELL *et al.*, 1996a).

O uso da restrição de SFB para a sincronização de células doadoras na TNS animal, foi salientado no artigo original do nascimento da ovelha Dolly (WILMUT *et al.*, 1997). Em bovinos, a indução de fibroblastos a entrarem em fase G1/G0 do ciclo celular mediante a privação de soro visando a TNS foi descrita inicialmente por Zakhartchenko *et al.* (1999). Os dois grupos de pesquisa sugeriram haver um efeito benéfico da privação de soro sobre o desenvolvimento *in vivo* dos embriões bovinos reconstruídos.

Além da restrição de soro, há outros artigos mostrando outras possibilidades de sincronização como, por exemplo, a confluência celular e a utilização de inibidores de proteínas de controle do ciclo celular (CDKs), entretanto ainda não há um consenso sobre o método mais eficaz de sincronização de células doadoras de núcleo para a TNS (OBAKC e WELLS, 2005).

Neste experimento foi avaliado um método de sincronização do ciclo celular de fibroblastos bovinos adultos (baseado na restrição de SFB durante dois períodos) e foi mostrado que a restrição de soro foi eficiente em sincronizar a maioria das células na fase G0/G1 do ciclo celular, uma vez que, em média, cerca de 80% das células foram sincronizadas nesta fase do ciclo celular.

Stice *et al.* (2000) propuseram que a restrição de soro apesar de ser um eficiente método de sincronização do ciclo celular para a TNS, pode aumentar a ocorrência de MCP e necrose, levar à replicação inadequada do DNA e danos no DNA. Gibbons *et al.* (2002) mostrou que fibroblastos suínos submetidos às 48h de restrição de soro, apresentaram sobrevivência celular reduzida e fragmentação de DNA aumentadas.

Neste sentido, foi verificado e mostrado que somente 24h de restrição de soro foram suficientes para sincronizar 82,6% das células em fase G1/G0 do ciclo celular, não havendo um aumento nesse número quando as células foram mantidas em restrição por mais 48 h (83,3%). O que está de acordo com o mostrado por Hayes *et al.* (2005) que também não observaram aumento de sincronização quando os fibroblastos bovinos foram mantidos por 24, 72 ou 120 h sob restrição de SFB, com as taxas ficando na média de 80 %. Portanto, o protocolo de restrição de soro por 24h foi o escolhido para ser utilizado na continuação do experimento.

Oócitos bovinos são capazes de promover o desenvolvimento de embriões clonados a partir de células somáticas de quatro espécies diferentes, no chamado xenotransplante nuclear (DOMINKO *et al.* (1999), resgatar pronúcleos tratados com peróxido de hidrogênio LIU e KEFEE (2000) e ate mesmo permitir a produção de ovelhas viáveis a partir de fibroblastos desnaturados pelo calor (aquecidos a 55°C ou 75°C) cujo material genético se encontrava já ao nível nucleossomal de organização (LOI *et al.*, 2002).

Neste estudo foi mostrado que células em processo de MCP, identificadas mediante o ensaio de identificação da FS (Anexina V), foram reprogramadas quando utilizadas para a transferência nuclear gerando inclusive o nascimento de um indivíduo. Entretanto, ficou claro que o uso destas células afetou negativamente o desenvolvimento embrionário e que a seleção de células Vivas proporciona um ganho destas taxas.

A redistribuição do fosfolípido FS da face interna da membrana plasmática para a face externa é considerado um evento inicial da MCP e pode ser detectado pela ligação da FS pela proteína Anexina V conjugada com um fluoróforo como o isotiocianato de fluoresceína (FITC). Este método é um método amplamente utilizado e permite a análise da MCP de células vivas mediante a citometria de fluxo (CLODI *et al.* 2000). Sendo, portanto o método escolhido para a detecção da MCP neste experimento, uma vez que buscamos utilizar as células para a TNS após a análise por citometria de fluxo.

A taxa de MCP observada nos fibroblastos bovinos utilizados neste experimento para TNS foi de aproximadamente 15,1% e a taxa de necrose foi de 3,6%, o que está de acordo com o observado por Cho *et al.* (2005) que reportou taxas de MCP de 10,4% após a restrição de soro de fibroblastos fetais bovinos.

Com relação ao uso de células em MCP para o desenvolvimento embrionário, observou-se inicialmente que o fato da célula estar ou não em processo de MCP não influenciou nas taxas de fusão aos oócitos enucleados o que pode ser explicado pelo fato de que somente em estádios mais avançados da MCP ou na necrose, ocorre a permeabilização da membrana plasmática celular. Neste experimento, células em MCP tardia e células necróticas não foram utilizadas, exceto no grupo Controle que continha a mistura de todas as células.

O desenvolvimento do grupo de embriões reconstruídos com células em MCP, não diferiu do grupo Controle ($p > 0,05$) com relação taxas de clivagem e blastocisto (72,7% e 18,8% vs 77,3 e 27,3%, respectivamente), porém ambos foram significativamente inferiores as taxas de clivagem e blastocisto obtidas pelo uso de células Vivas (83,4 e 34,7%). Em outras palavras observamos que apesar de estarem em MCP, pelo menos alguns

fibroblastos bovinos foram reprogramados pelo oócito uma vez que um animal viável foi obtido.

Sabe-se que a MCP é um processo de autodestruição caracterizado por mudanças ultra estruturais celulares como a desidratação celular, diminuição do potencial de membrana mitocondrial, ativação de caspases, fragmentação do citoplasma, condensação da cromatina nuclear, desintegração do envelope nuclear e clivagem inter nucleossomal do DNA (CLODI *et al.*, 2000; DUMONT *et al.* 2000). A MCP pode ser didaticamente dividida em quatro estádios: estímulo, sinalização, regulação e fase efetora.

Já se sabe também que o processo de MCP se trata de um processo reversível dependendo do estágio de evolução das suas etapas (MORITA e TILLY, 1999; CLODI *et al.*, 2000), ou seja, a reversibilidade do processo vai até determinada fase/etapa. Este limite que determina a reversibilidade ou não do processo é chamado de “ponto de não-retorno” e ainda não é conhecido (SPAN *et al.*, 2002).

Como já descrito por Peng *et al.* (1998), Kues *et al.* (2000) e Cho *et al.* (2005), o protocolo de restrição de soro *in vitro* estimula a ocorrência da MCP em células cultivadas *in vitro*, porém esta indução não pode ser considerada tão sincronizada e tão forte quanto uma indução química com drogas causadoras de MCP como a Dexametasona, a Menadiona, a Estaurosporina, etc.

Uma vez que a externalização da FS é um evento inicial e que perdura até as fases finais do processo de MCP, uma possível explicação para os resultados é que a população de fibroblastos utilizada no grupo MCP seja, portanto, uma população heterogênea com relação a curso do processo de morte. Desse modo, dependendo do estágio ou da superação ou não do “ponto de não-retorno” da MCP, a célula foi reprogramada ou não pelo oócito bovino.

O uso de células em MCP como doadoras de núcleo não aumentou significativamente ($p > 0,05$) o índice de MCP nos blastocistos produzidos ($0,06 \pm 0,06$) em comparação ao grupo Vivas ($0,04 \pm 0,02$) e o grupo Controle ($0,03 \pm 0,01$). Também não foi observada redução do índice de MCP quando células Vivas foram utilizadas como doadoras de núcleo em comparação as células Controle ($p > 0,05$). Apesar do índice de MCP normal, os embriões reconstruídos a partir de células em MCP possuíram número total de blastômeros inferior ($63,2 \pm 10,7$) comparado com o grupo reconstruído a partir de células Controle ($114,6 \pm 37,2$; $p = 0,07$) e células Vivas ($105,6 \pm 41,1$; $p = 0,07$).

Diversos trabalhos têm estudado os efeitos oriundos das células somáticas (i.e diferentes protocolos de sincronização, tipos celulares, repiques celulares, etc.) sobre o posterior desenvolvimento dos embriões clonados (KATO *et al.*, 1999; LOI *et al.*, 2002; JANG *et al.*, 2004; HAYES *et al.*, 2005). Park *et al.* (2004), mostrou um efeito benéfico do uso de inibidores de MCP nas células somáticas doadoras de núcleo sobre o posterior desenvolvimento dos embriões clones mediante a observação da redução da apoptose nos embriões produzidos, indicando que, o estado fisiológico da célula doadora de núcleo influencia no posterior desenvolvimento do embrião clonado.

Apesar do grupo clonado a partir de células Vivas ter apresentado os melhores resultados de desenvolvimento embrionário, com relação às taxas de prenhez se tratou do pior grupo, com perda total das gestações entre os dias 30 e 60 da gestação.

Um resultado interessante foi que assim como reportado para o desenvolvimento embrionário, o grupo reconstruído com células em MCP apresentou uma taxa de prenhez similar ao grupo Controle apesar do efeito negativo do uso de células em MCP no desenvolvimento embrionário.

Provavelmente, o número de células que foram reprogramadas foi limitante, mas a partir do momento que houve a reprogramação esta ocorreu de forma similar a uma célula Controle gerando embriões com capacidade de implantação e desenvolvimento a termo, similares aos embriões Controle.

7) Resumo dos Resultados

1) A restrição de SFB por 24h foi suficiente para sincronizar fibroblastos bovinos adultos em fase G1/G0 do ciclo celular para que possam ser utilizados como doadores de núcleo na técnica de TNS animal.

2) Fibroblastos bovinos adultos em processo de MCP, identificado pelo ensaio da Anexina V e separados por citometria de fluxo, podem ser reprogramados na técnica de TNS animal, sendo até mesmo possível a obtenção de indivíduos viáveis.

3) O uso de fibroblastos bovinos em processo de MCP, como doadores de núcleo, reduziu a capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto e aumentou a ocorrência de MCP nos embriões produzidos.

4) O uso de fibroblastos bovinos, que não estavam em processo de MCP, melhorou as taxas de desenvolvimento dos embriões clones. Porém piorou a capacidade de manutenção de prenhezes.

8) Conclusões

1) Fibroblastos bovinos adultos em processo de MCP, identificado pelo ensaio da Anexina V e separados por citometria de fluxo, podem ser reprogramados na técnica de TNS animal, sendo até mesmo possível a obtenção de indivíduos viáveis.

2) O uso de fibroblastos bovinos em processo de MCP, como doadores de núcleo, reduziu a capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto e aumentou a ocorrência de MCP nos embriões produzidos.

CAPÍTULO 3

USO DE FIBROBLASTOS BOVINOS EM PROCESSO DE MCP NA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA NUCLEAR: EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM A ESTAUROSPORINA

Resumo

MIRANDA, M.S. **Uso de fibroblastos bovinos em processo de MCP na técnica de transferência nuclear: Efeito do tempo de tratamento com a estaurosporina.** Tese de Doutorado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

Fibroblastos bovinos em processo de morte celular programada (MCP) podem ser reprogramados quando utilizados na técnica de transferência nuclear somática (TNS), porém não está claro se células em diferentes fases do processo de morte podem ser utilizadas. Neste trabalho, a estaurosporina (STP) foi utilizada para induzir MCP em fibroblastos em diferentes tempos de incubação. Células em processo de morte foram utilizadas para a TNS em cada um dos tempos de tratamento com a STP de modo a avaliar o efeito da progressão do tempo do processo de morte sobre o desenvolvimento dos embriões clones. Fibroblastos foram cultivados até atingirem aproximadamente 60% de confluência, sincronizados por restrição de soro por 24 h e tratados com 50 μ M de STP por 1, 12 e 24 h. A MCP foi analisada por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V/Iodeto de propídeo (PI). Células Anexina positivas (MCP) e Anexina-negativas (Vivas) foram separadas por citometria de fluxo e utilizadas como doadoras de núcleo na TNS. Células não coradas e não separadas no citômetro serviram como controle (Controle). Os embriões reconstruídos foram avaliados quanto à taxa de fusão e cultivados em estufa com 5% de CO₂ sendo avaliados com relação à clivagem (2º dia de cultivo) e formação de blastocisto (7º dia). O percentual de MCP ao longo do tempo foi analisado com ANOVA e os parâmetros embrionários com o teste de χ^2 adotando-se nível de significância de 5%. Apesar de não ter havido diferença significativa ($p>0,05$) o tratamento com a STP aumentou a taxa de células em MCP com 1 h de tratamento (40,4%) em comparação as células não tratadas (15,1%). Esta taxa de manteve elevada com 12 h (39,2%) e reduziu ligeiramente 24h após o tratamento (35,1%). Observou-se redução ($p=0,08$) na taxa de clivagem (40,3%) e desenvolvimento a blastocisto (11,1%) quando células em MCP por 1h foram utilizadas para a TNS em comparação ao uso de células controle (55 e 21,7%, respectivamente). O uso de células em MCP por 12h reduziu ($p<0,05$) somente a taxa de formação de blastocisto (14,6%) em comparação ao Controle (26,8%). O uso de células em MCP por 24h não influenciou no desenvolvimento dos embriões. Conclui-se que ao contrário do esperado, houve melhora de desenvolvimento de embriões clonados a partir de células em MCP oriundas de culturas tratadas por um período prolongado de tratamento com a STP. A observação de que não houve fragmentação nuclear das células ao longo do tratamento sugere que pode ter havido um estímulo insuficiente do processo de MCP neste experimento.

Palavras-chave: transferência de núcleo, MCP, separação celular, STP.

Abstract

MIRANDA, M.S. **Use of fibroblasts in process of programmed cell death (PCD) for nuclear transfer (NT): effect of exposure time to staurosporine on developmental rates.** *PhD. Thesis – Animal Science and Food Engineering Faculty, University of Sao Paulo, Pirassununga, 2009.*

Bovine fibroblasts in programmed cell death process (PCD) can be used as nuclear donors for nuclear transfer (NT), however it is not clear if there is any effect when cells in more advanced phases are used. Staurosporine (STP) was used for 1, 12 and 24h to induce PCD in bovine fibroblasts. Cells with phosphatidylserine (PS) exposure were detected with Annexin V assay over the time of STP treatment, sorted and used for NT. Fibroblasts at 60% confluency were synchronized with serum starvation for 24h and treated with 50 μ M STP for 1, 12 and 24h. The percent of Annexin positive cells (PCD cells) and Annexin negative cells (Live cells) was analyzed and the cells were sorted for NT. Untreated, unstained, unsorted cells served as control (Control cells). Fusion rate was recorded and successfully fused embryos were cultivated (5% CO₂ incubator) in SOF medium and evaluated for cleavage (on day 2 of culture) and blastocyst (day 7 of culture) rates. The percent of PCD in fibroblasts over the time was analyzed by ANOVA and data from embryonic development by Chi-square test ($p < 0.05$). The STP stimulated PCD in bovine fibroblast. PCD increased within 1h, reached a plateau phase at 12h and showed a slightly reduction at 24h after STP treatment. Since cell sorting, the use of PCD cells from 1h STP treated cultures decrease ($p = 0.08$) cleavage rate and blastocyst production compared to Control cells. A similar pattern was observed at 12h STP treatment, with PCD cells reducing blastocyst production compared to Live cells ($p < 0.05$). At 24h of STP treatment, embryos reconstructed with PCD, Live and Control cells showed similar developmental rates ($p > 0.05$). In conclusion, interestingly cells in PCD from cultures treated with STP for a prolonged time, showed better developmental rates when used as nuclear donors for NT. The absence of nuclear fragmentation observed during STP treatment even for 24h suggests incomplete PCD stimuli leading to an adaptive condition in the cells and promoting poor embryo production from cells treated for 1 and 12h of STP and good embryo production from cells treated for 24h.

Key-words: nuclear transfer, PCD, Annexin fibroblasts, STP, cell sorting.

1) Introdução

Na técnica de transferência nuclear o núcleo das células somáticas é transferido para o interior do citoplasma de um oócito enucleado. Em seguida o núcleo recém transferido sofre um processo de reprogramação epigenético que se traduz em modificações estruturais e funcionais associadas com a reaquisição da pluripotência ou totipotência, dando origem a um novo embrião e indivíduos viáveis (HEYMAN, 2005).

A produção de animais pela técnica de TNS animal tem muitas aplicações importantes na pesquisa básica, medicina e agricultura. Diferentes espécies animais como ovelhas (SCHNIEKE *et al.*, 1997; WILMUT *et al.*, 1997), cabras (BAGUISI *et al.*, 1999), camundongos (WAKAYAMA *et al.*, 1999), porcos (POLEJAEVA *et al.*, 2000), bovinos (CIBELLI *et al.*, 1998; KATO *et al.*, 1998; WELLS *et al.*, 1999), gatos (SHIN *et al.*, 2002), coelhos (CHESNE *et al.*, 2002), cavalos (GALLI *et al.*, 2003), cachorros (LEE *et al.*, 2005) e búfalos (SHI *et al.*, 2007) já foram clonadas com sucesso a partir de células somáticas adultas, entre outros.

Independentemente do mais variados motivos pelos quais a TNS é utilizada, da espécie eleita, do tipo celular escolhido ou do tratamento pré-TNS utilizado, um consenso na comunidade científica é que há no interior do oócito maduro fatores ainda desconhecidos que são responsáveis pela reprogramação nuclear os quais possibilitam a remoção do padrão epigenético da célula doadora e o restabelecimento do padrão epigenético embrionário e, portanto o desenvolvimento embrionário adequado (YANG *et al.*, 2007) e que a elucidação destes mecanismos envolvidos neste reinício da programação do desenvolvimento embrionário continua sendo um fenômeno biológico intrigante.

Neste sentido, alguns autores têm “desafiado” a capacidade fantástica do oócito em modificar a cromatina introduzida em seu interior.

Inicialmente, Dominko *et al.* (1999) mostraram que o citoplasma oocitário bovino foi capaz de promover o desenvolvimento de embriões clonados a partir de células somáticas de quatro espécies diferentes (xenotransplante nuclear). Camundongos clonados a partir de linfócitos B, neurônios olfatórios e granulócitos (HOCHEDLINGER e JAENISCH, 2007) e a TNS de bovinos a partir de células musculares extremamente diferenciadas (GREEN *et al.*, 2007) também são exemplos do grande potencial de reprogramação existente no oócito.

Liu e Kefee (2000), utilizando a técnica de transplante pronuclear, mostraram que o oócito de camundongo foi capaz de “resgatar” pronúcleos tratados com peróxido de hidrogênio quando estes foram introduzidos em citoplasmas não tratados. Loi *et al.* (2002) clonaram ovelhas viáveis a partir de fibroblastos desnaturados pelo calor (aquecidos a 55°C ou 75°C) cujo material genético se encontrava já ao nível nucleossomal de organização.

A MCP é um processo reversível dependendo do estágio de evolução das suas etapas, ou seja, a reversibilidade do processo vai até determinada fase/etapa (MORITA e TILLY, 1999; CLODI *et al.*, 2000). Este limite que determina a reversibilidade ou não do processo é chamado de “ponto de não-retorno”, o qual ainda não é conhecido (SPAN *et al.*, 2002).

Neste experimento, foi proposto um novo “desafio” ao potencial de reprogramação do oócito bovino ao utilizar fibroblastos bovinos em diferentes momentos após o estímulo do processo de MCP de modo a verificar se o oócito bovino é capaz de resgatar células em processo de morte e investigar até que momento esta reversão pode ser obtida.

2) Justificativa

Nos resultados do experimento anterior (Capítulo 2), foi mostrado que células em MCP foram reprogramadas quando utilizadas como doadoras de núcleo na técnica de TNS animal.

Foi observada uma redução nas taxas de desenvolvimento dos embriões produzidos a partir destas células, o que indica que provavelmente somente algumas das células em MCP foram reprogramadas pelo oócito e especulou-se que a heterogeneidade da população de células em MCP em diferentes fases do processo pode ter influenciado os resultados.

Neste sentido, se tornou interessante avaliar a possibilidade da reprogramação dos fibroblastos em processo de MCP induzido por um agente químico, de modo a sincronizar o início da MCP, e em diferentes tempos de indução a fim de avaliar até quando o processo pode ser revertido mediante o uso da transferência nuclear.

3) Hipótese Experimental

Fibroblastos bovinos em processo de MCP, induzida pela STP, podem ser reprogramados quando utilizados como doadores de núcleo na técnica de transferência nuclear.

Há um efeito negativo do tempo de indução do processo de morte nos fibroblastos sobre a posterior utilização dos mesmos na TNS.

4) Objetivos

4.1) Geral

Avaliar se fibroblastos bovinos, em processo de MCP, induzida pela STP, são capazes de gerar embriões viáveis quando utilizados como doadores de núcleo na técnica de transferência nuclear.

4.2) Específicos

4.2.1) Nas Células Somáticas

1) Mediante um experimento dose-resposta, determinar o tratamento com STP mais eficaz na indução da MCP de fibroblastos bovinos se baseando no ensaio da Anexina V.

2) Uma vez escolhida a dose do tratamento, determinar o curso-temporal do processo de MCP nos fibroblastos baseando-se no ensaio da Anexina V.

4.2.2) Nos Embriões Reconstruídos

1) Analisar as taxas de fusão, clivagem e posterior desenvolvimento até o estágio de blastocisto dos embriões produzidos com fibroblastos em processo de MCP.

5) Material e Métodos

5.1) Obtenção e Manutenção das Culturas de Fibroblastos.

As células somáticas doadoras de núcleo foram obtidas a partir de biópsias realizadas de fêmea adulta. A biópsia foi retirada da prega da cauda do animal e transportada imediatamente para o laboratório em solução tampão fosfato (PBS) em gelo. O tecido foi então triturado em pequenos pedaços de aproximadamente 1 mm, lavados em PBS e transferidos para uma placa de Petri de 35 mm de diâmetro. O cultivo procedeu-se em meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), piruvato (22 µg/mL), glutamina (1mM) e gentamicina (50 µg/mL). A incubação foi realizada a temperatura de 38,5°C e atmosfera gasosa de 5% CO₂ em ar, trocando-se o meio a cada três dias.

Após o crescimento das primeiras células, o meio foi substituído por DMEM suplementado com 10% de SFB e o cultivo processado até a 3ª passagem, momento no qual as células foram criopreservadas em nitrogênio líquido em meio DMEM suplementado com 20% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Durante a realização dos experimentos, amostras de células foram descongeladas mantidas em DMEM com 10% de SFB até o momento da utilização nos experimentos. Foram utilizadas nos experimentos células entre a 4ª e a 10ª passagens.

5.2) Protocolo de Sincronização do Ciclo Celular.

De acordo como determinado no experimento anterior, os fibroblastos oriundos de culturas não confluentes, foram plaqueados em garrafas de 25 cm² (60% de confluência) em DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24h do plaqueamento, o meio foi substituído por DMEM suplementado com 0,5% de SFB (restrição de SFB) no qual as culturas permaneceram por 24 h.

Em seguida as células foram induzidas ou não a entrarem em MCP de acordo com os experimentos propostos.

5.3) Determinação da Concentração de Estaurosporina (STP) utilizada para a Indução da MCP (Experimento Dose-Resposta).

Após o protocolo de sincronização do ciclo celular, os fibroblastos foram tratados com 0,1, 1, 10, 50 e 100 µM de STP (Sigma) por 24 h. Neste experimento, a STP foi obtida a partir de uma solução estoque (1 M) que havia sido previamente utilizada no laboratório e que estava armazenada em freezer – 70 °C.

Após o tratamento, a MCP foi determinada por citometria de fluxo FACS Aria (BD Bioscience) mediante a marcação da exposição da FS pela técnica da Anexina V (Apoptest-FITC; Nexins Research, Hoeven, Holanda). As células foram tripsinizadas e ressuspensas em tampão de ligação (fornecido no kit) contendo Anexina V (10 µg/mL) por 15 minutos protegidas da luz. Após a coloração com a Anexina, as células foram coradas com iodeto de propídeo (1 µg/mL) e imediatamente analisadas por citometria de fluxo.

Foram avaliadas 5.000 células por amostra em cada repetição sendo que o experimento foi repetido três vezes. Foi calculada pelo citômetro a distribuição percentual das quatro categorias de células: células em processo de MCP (marcadas somente com a Anexina), vivas (com nenhuma marcação), necróticas (marcação somente para iodeto de propídeo) e em processo de MCP tardio (marcadas tanto para a Anexina quanto para o iodeto de propídeo). Um grupo de células não coradas foi utilizado para o ajuste da fluorescência basal (*background*).

A dose de STP escolhida foi a que apresentou maiores taxas de MCP com as menores taxas de necrose, de modo a garantir uma indução mais específica da MCP em si. A STP foi utilizada na proporção 1:1000 a partir de um estoque diluído em DMSO e para cada repetição, foi determinada a taxa de MCP de uma cultura de células tratadas apenas com DMSO (Controle).

5.4) Determinação do Curso Temporal do Processo de MCP induzido pela STP

Após a determinação da concentração de STP a ser utilizada, os fibroblastos foram tratados com 50 μ M de STP por 1, 12 e 24 h. Após o tratamento, a MCP foi determinada por citometria de fluxo (BD – FACSAria) utilizando-se a marcação da exposição da FS pela técnica da Anexina V seguindo a mesma metodologia descrita na determinação da concentração de STP.

5.5) Produção dos Embriões Clonados

5.5.1) Maturação *in vitro* dos oócitos bovinos

Ovários de vacas zebus ou mestiças foram obtidos em abatedouro, transportados em solução salina (0,9%) a 37°C, e encaminhados até o laboratório. Os complexos *cumulus*-oócito foram aspirados de folículos entre 2 a 8 mm utilizando uma seringa de 10 mL acoplada a uma agulha 18 G, e somente os oócitos de qualidade I, com *cumulus* compacto completo e citoplasma límpido e de aspecto homogêneo (finas granulações), foram selecionados para os experimentos. Os oócitos foram, em seguida, maturados em TCM199 com sais de Earle, glutamina e NaHCO₃ suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), piruvato (22 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), 0,5 µg de FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1 µg de estradiol/mL em microgotas de 100 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral (15 oócitos/gota). A incubação foi realizada à temperatura de 38,5°C e atmosfera gasosa de 5% CO₂ em ar, durante 18 h.

5.5.2) Transferência nuclear – Seleção do corpúsculo polar e enucleação dos oócitos.

Após 18 h do início da maturação, as células do *cumulus* foram removidas por exposição à solução de hialuronidase (2 mg/mL) em PBS simples acrescido de 0,4% de BSA e os oócitos foram selecionados pela presença do 1º corpúsculo polar. Em seguida, foram transferidos para uma solução de citocalasina B (10 µg/mL) e Hoechst 33342 (10 µg/mL) em meio SOF (VAJTA *et al.*, 1999) suplementado com 2,5% de SFB e 0,5% de albumina sérica bovina BSA durante 15 minutos.

Após a seleção e coloração, os oócitos foram transferidos para a gota de micromanipulação com meio HEPES-SOF (WELLS *et al.*, 1999) suplementado com 7,5 µg/mL de citocalasina B sob microscópio invertido

(Leica - Germany) equipado com sistema de luz ultravioleta. Os oócitos foram então enucleados, removendo uma pequena porção do citoplasma próxima à região do 1º corpúsculo polar (eliminação do material genético do oócito). Esta porção aspirada foi visualizada sob luz ultravioleta para confirmação da enucleação. Após a enucleação, todos os oócitos foram recolocados em meio SOF e retornaram para a estufa de cultivo.

5.5.3) Transferência nuclear – Separações celulares (cell sorting) e reconstrução embrionária com as células em processo de MCP.

Após a enucleação de todos os oócitos, os fibroblastos foram tripsinizados, corados e analisados no citômetro quanto à ocorrência da MCP (marcação pela Anexina V). Em seguida, foi realizada a separação citométrica das populações celulares (FACS - *fluorescence activated cell sorting*) de acordo com o padrão de marcação da Anexina V. Foram preparados tubos de 15 mL com DMEM suplementado com 0,5% de SFB e foram separadas as populações de células (1) Anexina positivas / iodeto de propídeo negativas e (2) Anexina negativas/iodeto de propídeo negativas, sendo 3.000 células de cada.

Neste experimento vale ressaltar que, para a separação das células foram desenhados dois novos “*gates*” dentro das categorias MCP e Vivas (Figura 15). Esta metodologia objetivou garantir uma maior segurança e pureza das populações de células separadas pelo citômetro.

Figura 15. *Dot plot* gerado pelo citômetro de fluxo no qual é mostrado o padrão de leitura da marcação das células pela Anexina V (eixo X) e iodeto de propídeo (eixo Y) e os respectivos quadrantes gerados. (A) *dot plot* de células não coradas para ajuste da fluorescência basal (*background*); (B) *Dot plot* da análise das células coradas com a Anexina V e o iodeto de propídeo mostrando os quadrantes e os dois *gates* desenhados (Separ. Vivas e Separ. MCP) de modo a gerar um espaço de segurança entre as duas populações separadas.

Após a separação as células foram centrifugadas e transferidas para a gota de micromanipulação juntamente com os oócitos previamente enucleados. Uma única célula foi então inserida no espaço perivitelíneo de cada um dos oócitos perfazendo dois grupos experimentais de embriões reconstruídos: Positivo (reconstruídos com células Anexina V positivas) e Negativo (reconstruídos com células Anexina V negativas).

Outro cultivo celular foi preparado da mesma forma e as células deste cultivo foram utilizadas para a reconstrução de alguns embriões (Grupo Controle). A etapa da transferência das células somáticas dos três grupos experimentais não ultrapassou o tempo total de 1 h.

Os conjuntos oócitos-células somáticas foram eletricamente fundidos 24 h após o início da maturação em uma solução contendo 0,3 M de manitol, 0,1 mM $MgSO_4$, 0,5 mM Hepes e 0,05% BSA. Os embriões reconstruídos foram alinhados manualmente de maneira que a superfície de contato entre o oócito e a célula estava paralela aos eletrodos. As células

foram, então, expostas a dois pulsos elétricos de 2,25 kV/cm durante 45 μ S cada pulso. Aproximadamente uma hora e meia após a eletrofusão (completando 26h após o início da maturação), a taxa de fusão foi avaliada e os oócitos fundidos foram quimicamente ativados em 5 μ M de Ionomicina durante 4 minutos e, em seguida, cultivados em meio SOF com 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6DMAP) durante 3 h.

Ao término do período de ativação, os oócitos foram cultivados em meio SOF suplementado com 2,5% de SFB, 0,5% de BSA e co-cultivo com células da granulosa da maturação. O cultivo foi feito em estufa a temperatura de 38,5°C, atmosfera de 5% CO₂ em ar durante sete dias. No segundo dia de cultivo, os embriões foram retirados para a análise da taxa de clivagem e no sétimo dia de cultivo, os embriões foram reavaliados quanto à formação de blastocistos.

5.6) Produção dos embriões partenogénéticos.

Em todos os experimentos onde foram produzidos os embriões clones, foram também produzidos embriões partenogénéticos que serviram como controle da qualidade do processo de ativação e das condições de cultivo *in vitro*. Para tanto, em cada repetição, um grupo de oócitos não micromanipulados foram ativados em 5 μ M de Ionomicina durante 4 minutos e, em seguida, cultivados em meio SOF com 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6DMAP) durante 3h. Após a ativação os embriões foram cultivados em meio SOF e avaliados de acordo como descrito para os embriões clonados.

5.7) Análise Estatística

Todos os dados referentes às análises celulares foram transformados para Arco-Seno e analisados pela ANOVA adotando-se o nível de significância de 5%. Quando necessário, foi utilizado pós-teste de Bonferroni.

Para todas dados referentes ao desenvolvimento embrionário, foi utilizado o teste do X^2 adotando-se níveis de significância de 5%. O nível de significância de 10% foi adotado somente quando mencionado.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software BioEstat 4.0 (AYRES *et al.*, 2005).

6) Resultados

6.1) Determinação da concentração de STP utilizada para a indução da MCP.

O tratamento com a STP foi eficaz em induzir a MCP dos fibroblastos como pôde ser observado pela alteração morfológica das células em cultivo e pelos resultados positivos da marcação com a Anexina V (Figuras 16 e 17).

Figura 16. Fotomicrografia do cultivo celular do experimento dose-resposta de STP. As células foram coradas por 10 minutos com Hoechst (5 μ g/mL) e visualizadas em microscópio sob a luz comum (morfologia celular) e ultravioleta (núcleos em azul). (A) células do grupo controle não tratadas com STP e (B) células tratadas com 50 μ M de STP por 24h (aumento 200X).

Os resultados do experimento de dose-resposta mostraram que, de acordo com o aumento da concentração de STP utilizada, houve o aumento da taxa de células em MCP e uma redução gradativa na taxa de células Vivas. Com taxas de MCP de 41,5 e 43,5%, as concentrações de 50 e 100 μ M respectivamente foram as que mostraram os melhores resultados em relação às demais concentrações não diferindo entre si ($p > 0,05$).

As taxas de MCP tardia e necrose nestas concentrações, e mesmo em concentrações inferiores, foram muito baixas o indicando que o tratamento com a STP causou especificamente MCP mais do que necrose (Figura 17).

Figura 17. Gráfico dos resultados do experimento para determinação da concentração de STP. Os fibroblastos foram tratados com a droga por 24h e analisados por citometria de fluxo quanto à marcação com a Anexina V e iodeto de propídeo. Asteriscos indicam diferença estatística ($p < 0,05$) dentro de cada categoria de células.

6.2) Determinação do Curso Temporal do Processo de MCP Induzido pela STP.

Este experimento foi repetido três vezes e os resultados são mostrados nas Figuras 18 e 19.

Houve aumento imediato da taxa de MCP 1h após o tratamento com 50µM de STP. Este aumento foi mantido até as 12h após o tratamento sendo que 24h após, foi observada uma ligeira redução da taxa. Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os valores ($p > 0,05$).

Figura 18. Dot plots onde pode ser observado o padrão de leitura da marcação das células pela Anexina V (eixo X) e iodeto de propídeo (eixo Y) após o tratamento com 50 μ M de STP por 1, 12 e 24h (Controle, não tratado). O ajuste da fluorescência basal foi feito mediante a leitura de uma amostra de células não coradas (Background). Os valores obtidos em cada quadrante analisado são mostrados no gráfico.

Figura 19. Curso-temporal da marcação da Anexina V em fibroblastos tratados com 50 μ M de STP por 1, 12 e 24h ($p>0,05$).

Foi realizada a análise da morfologia citoplasmática e nuclear dos fibroblastos, ao longo do tratamento com a STP, mediante a coloração com o fluorocromo Hoechst 33342 (10 μ g/mL) e observação em microscópio de fluorescência (Figura 20).

Observou-se que com 1h após o tratamento com a STP, houve mudança muito grande na morfologia dos fibroblastos. Praticamente todas as células em cultivo se tornaram mais condensadas e adquiriram um aspecto “estrelado”, semelhante ao de células nervosas. Sendo que esse padrão de modificação morfológica foi se evidenciando ainda mais de acordo com o prolongamento do tratamento com a STP.

Figura 20. Fotomicrografia de fibroblastos bovinos tratados com 50 μ M de STP por diferentes tempos. Os núcleos celulares (em azul) foram coradas com Hoechst 33342 (10 μ g/mL) e fotografados em microscópio equipado com fluorescência. As imagens representam uma sobreposição de imagens obtidas com o contraste de fase em luz comum e luz U.V. (CTRL) células não tratadas com STP. As células foram tratadas com STP por 1, 12 e 24h conforme indicado nas figuras. Notar a grande mudança na morfologia dos fibroblastos tratados com a STP já com 1h. Não foi verificado sinal de fragmentação nuclear ao longo do tratamento. Aumento de 100X.

Com relação à morfologia nuclear, verificou-se que com 1h de tratamento com STP, o núcleo de algumas células se tornou mais condensado. Com 12h e 24h de tratamento de STP também se observou algumas células com núcleo condensado, porém não foi detectada fragmentação nuclear típica do processo de MCP, mesmo 24h após o tratamento com a STP.

6.3) Produção dos Embriões Clonados – Em Diferentes Tempos após o Estímulo da MCP.

Os resultados foram divididos em duas tabelas. Na Tabela 4, são mostrados os resultados das clonagens utilizando-se as diferentes categorias de células em cada um dos tempos após o tratamento.

Não houve diferença significativa entre as taxas de fusão das três categorias de células utilizadas em nenhum dos tempos após o tratamento com a STP ($p>0,05$). Com relação à taxa de clivagem, embriões clonados a partir de células em processo de MCP apresentaram uma taxa menor em relação aos demais grupos de embriões somente no tempo de 1h após o tratamento com a STP ($p<0,05$), não diferindo nos demais tempos ($p>0,05$). Com relação ao desenvolvimento ao estágio de blastocisto dos embriões clones, os resultados variaram dependendo do tempo de tratamento das células doadoras.

Quando as células foram tratadas com STP por 1h, os embriões clonados a partir de células em processo de MCP renderam menores taxas de desenvolvimento em relação aos embriões clonados a partir de células Controle (11,1 vs 21,7; $p=0,08$) e partenogenéticos (11,1 vs 63,8%; $p<0,01$) não diferindo do grupo Vivas ($p>0,05$).

O mesmo resultado foi observado quando as células foram tratadas com STP por 12h, sendo o desenvolvimento de embriões clonados a partir de células em processo de MCP menor que os embriões do grupo Controle (14,6 vs 26,8% respectivamente; $p<0,05$) e embriões partenogenéticos (14,6 vs 43,2% respectivamente; $p<0,01$), não diferindo do grupo Vivas ($p>0,05$).

Quando as células foram tratadas com STP por 24h, os três grupos de embriões clones não diferiram entre si ($p>0,05$). O grupo de embriões partenogenéticos foi superior aos grupos clonados a partir de células em processo de MCP e Vivas ($p<0,05$) e semelhante ao grupo Controle ($p>0,05$).

Tabela 4. Resultados da TNS a partir das três categorias de células oriundas de culturas tratadas com 50 μ M de STP por diferentes tempos.

1h STP				
Células	No. Oócitos	No. Fundidos (%)	No. Clivados (%) ¹	No. Blast. (%) ^{1,2}
MCP	96	72 (75,7) ^a	29 (40,3) ^b	8 (11,1) ^b
Vivas	92	71 (77,8) ^a	40 (56,3) ^a	15 (21,3) ^{a, b}
Controle *	91	69 (76,6) ^a	38 (55,0) ^a	15 (21,7) ^a
Partenogênese	65	-	38 (58,4) ^a	41 (63,8) ^c
12h STP				
Células	No. Oócitos	No. Fundidos (%)	No. Clivados (%) ¹	No. Blast. (%) ¹
MCP	128	103 (80,5) ^a	58 (56,3) ^a	15 (14,6) ^b
Vivas	134	100 (74,6) ^a	56 (56,0) ^a	21 (21,0) ^{a, b}
Controle *	121	97 (80,2) ^a	46 (47,4) ^a	26 (26,8) ^a
Partenogênese	95	-	53 (55,8) ^a	41 (43,2) ^c
24h de STP				
Células	No. Oócitos	No. Fundidos (%)	No. Clivados (%) ¹	No. Blast. (%) ¹
MCP	90	66 (73,3) ^a	43 (65,2) ^a	13 (19,7) ^a
Vivas	97	72 (76,6) ^a	52 (72,2) ^a	15 (20,8) ^a
Controle *	92	61 (66,3) ^a	41 (67,2) ^a	13 (21,3) ^{a, b}
Partenogênese	63	-	43 (68,3) ^a	22 (34,9) ^b

* Fibroblastos não tratados com STP e não separados no citômetro de fluxo. ^{a, b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (teste do X², p<0,05).

¹Valores percentuais calculados sobre o número de fundidos. ² Na comparação MCP vs Controle, o nível de significância adotado foi de 10% (p=0,08).

Na Tabela 5, são mostrados os resultados de cada grupo experimental (cada categoria celular utilizada como doadora de núcleo) ao longo do tempo de tratamento com a STP.

Considerando-se somente a análise da TNS a partir de células em processo de MCP, não houve diferença na taxa de fusão e desenvolvimento a blastocisto entre os diferentes tempos de tratamento com STP ($p>0,05$). Foi observada redução significativa da taxa de clivagem somente quando as células foram tratadas com STP por 1h ($p>0,05$).

Para as clonagens a partir de células Vivas, verificou-se também que não houve diferença da taxa de fusão e desenvolvimento até blastocisto entre os diferentes momentos de tratamento com a STP, sendo observado um aumento significativo da taxa de clivagem quando as células foram tratadas com 24h de STP ($p<0,05$).

Nas clonagens realizadas com células Controle, houve uma redução da taxa de fusão quando as células foram mantidas em restrição de soro por mais 24h após a sincronização do ciclo celular (total de 48h de restrição de soro) em comparação as que foram mantidas por mais 12h (total de 36h) de restrição de soro (66,3 vs 80,2%, respectivamente; $p<0,05$). Já com relação à taxa de clivagem, a privação de soro por 36h, reduziu a taxa em comparação à restrição de soro por 48h (47,4 vs 67,2%, respectivamente; $p<0,05$).

Tabela 5 - Resultados da TNS, por categoria de célula utilizada como doadora de núcleo, nos três diferentes tempos após o tratamento com 50 μ M de STP.

MCP				
STP 50μM	No. Oócitos	No. Fundidos (%)	No. Clivados (%)	No. Blast. (%)
1h	96	72 (75,7) ^a	29 (40,3) ^a	8 (11,1) ^a
12h	128	103 (80,5) ^a	58 (56,3) ^b	15 (14,6) ^a
24h	90	66 (73,3) ^a	43 (65,2) ^b	13 (19,7) ^a
Vivas				
STP 50μM	No. Oócitos	No. Fundidos (%)	No. Clivados (%)	No. Blast. (%)
1h	92	71 (77,8) ^a	40 (56,3) ^a	15 (21,3) ^a
12h	134	100 (74,6) ^a	56 (56,0) ^a	21 (21,0) ^a
24h	97	72 (76,6) ^a	52 (72,2) ^b	15 (20,8) ^a
Controle*				
DMEM 0,5%	No. Oócitos	No. Fundidos (%)	No. Clivados (%)	No. Blast. (%)
1h	91	69 (76,6) ^{a, b}	38 (55,0) ^{a, b}	15 (21,7) ^a
12h	121	97 (80,2) ^a	46 (47,4) ^a	26 (26,8) ^a
24h	92	61 (66,3) ^b	41 (67,2) ^b	13 (21,3) ^a

* Fibroblastos não tratados com STP e não separados no citômetro de fluxo. ^{a, b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (teste do X², p<0,05).

Na Tabela 6, os resultados das clonagens em diferentes tempos após o tratamento das células com STP foram analisados em conjunto de modo a comparar os resultados das três categorias de células utilizadas para a TNS. Foi observado que houve um efeito negativo (p=0,08) sobre a taxa de formação de blastocistos mediante o uso de células em processo de MCP como doadoras de núcleos. Não havendo nenhum efeito sobre as taxas de fusão, clivagem ou desenvolvimento até o estágio de 8-células (p>0,05).

Tabela 6 - Resultado em conjunto, unindo-se os resultados dos três diferentes tempos de tratamento com a STP, da TNS a partir de diferentes categorias de células separadas por citometria de fluxo de acordo com o padrão de marcação com a Anexina V.

Geral					
	No. Oócitos	No. Fundidos (%)	No. Clivados (%)	No. 8-células (%)	No. Blast. (%) ¹
MCP	314	241 (76,7) ^a	130 (53,9) ^a	62 (47,3) ^a	36 (14,9) ^a
Vivas	323	243 (75,2) ^a	148 (60,9) ^a	76 (51,3) ^a	51 (20,9) ^b
Controle	304	227 (74,6) ^a	125 (55,0) ^a	51 (40,8) ^a	54 (23,7) ^b

^a, ^b Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (teste do χ^2 , $p < 0,05$). ¹ Na comparação MCP vs Vivas, o valor de P foi 0,08.

7) Discussão

A STP, um alcalóide isolado de culturas de *Streptomyces staurospores*, é um potente inibidor da proteína kinase C, e possui um grande espectro de atividades celulares. Segundo Yoshida *et al.* (1997) e Chae *et al.* (2000), a STP é capaz de bloquear a progressão do ciclo celular quando utilizada em baixas concentrações e induzir rapidamente a MCP em uma grande variedade de linhas celulares incluindo fibroblastos quando utilizada em altas concentrações (0,1 - 10 μ M).

Comparando-se os resultados do experimento dose-resposta a outros trabalhos na literatura que também utilizaram a STP como agente indutor de MCP, notam-se principalmente duas coisas: 1) salvo a publicação de Nunes *et al.* (2005), dificilmente são encontrados relatos de indução de MCP em cultivos primários de fibroblastos, sendo muito comum o uso de linhagens neoplásicas estabelecidas (Jukart e HeLa, por exemplo); 2) geralmente são empregadas concentrações muito menores de STP, que estimulam a MCP em taxas maiores que as taxas obtidas neste trabalho em um menor tempo de tratamento (YOSHIDA *et al.*, 1997 [0,1 μ M]; BOSSY-WETZEL *et al.*, 1998 [1 μ M STP]; HEISKANEN *et al.*, 1999 [5 μ M STP]; CHAE *et al.*, 2000 [0,1 μ M STP]; SMAILL *et al.*, 2001 [1 μ M STP]).

Os resultados obtidos com o experimento dose-resposta mostraram que houve aumento da ocorrência de células em MCP de acordo com o aumento da concentração de STP. Sendo que, nas concentrações de 50 e 100 μ M o percentual de MCP se estabilizou em aproximadamente 40% não havendo diferenças entre as duas concentrações.

A análise do curso-temporal da marcação pela Anexina V, mostrou que houve um aumento inicial da taxa de MCP logo após a indução (1h), seguido por uma estabilização 12h após o estímulo e então uma discreta redução após 24h do estímulo pela MCP.

Clodi *et al.* (2000) induziram MCP em linfócitos com Fludarabina (agente citostático análogo de purinas) e analisaram, entre outras coisas, o curso temporal da marcação com a Anexina V ao longo de 24h de tratamento. Foi observado que por volta de 7-10h após o tratamento, a marcação com a Anexina V atingiu o seu maior valor (~30%) sendo que no tempo de 20h esta taxa foi reduzida para aproximadamente a 20%, chegando a aproximadamente 10% com 24h de tratamento.

Span *et al.* (2002) estimularam a MCP em células Jukart tratadas com Campotecina por até 169h, coraram as células com Anexina V (Anx) e iodeto de propídeo (IP) e analisaram o percentual de células em MCP (Anx+/IP-) ao longo do tempo. Observou-se que a taxa de MCP nestas condições atingiu um *platô* entre 22 e 29h (~25%) após o início do tratamento e que a partir destes tempos foi sendo reduzida chegando próximo de 10% após 101h de tratamento.

Porém um fato discordante dos observados pelos dois autores citados acima, foi que neste experimento não ocorreu aumento do número de células em MCP tardia ao longo do tempo. Nem mesmo houve aumento do percentual de células necróticas. Tal fato sugeriu a possibilidade de que o estímulo de morte da STP foi insuficiente para que as células ultrapassassem o "ponto de não-retorno" do processo de morte.

Embriões clonados a partir de células em MCP apresentaram uma taxa de clivagem inferior (40,3%) ao grupo Vivas (56,3%), Controle (55,0%) e Partenogênese (58,4%), somente no tempo de 1h após o tratamento com a STP ($p < 0,05$), não havendo diferença nos tempos de 12 e 24h ($p > 0,05$).

A ocorrência da MCP em oócitos maduros de mamíferos ainda é um assunto muito discutido. Segundo Perez *et al.* (1999) a MCP no oócito maduro é muito baixa espontaneamente, porém, após o tratamento com altas doses de agentes indutores de MCP ela pode ser estimulada com o aparecimento de eventos bioquímicos e estruturais bem característicos. Sabe-se também que, a MCP é raramente observada nos estádios iniciais de

clivagem, mas que a maquinaria necessária esta presente. Matwee *et al.* (2000), em uma revisão sobre a ocorrência da MCP durante o desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro* mostraram que, somente após o estágio de 8-16 células pode ser observada a presença de blastômeros apoptóticos.

Neste experimento, foi observada uma “perturbação” do desenvolvimento embrionário inicial (redução na taxa de clivagem) quando células recém-estimuladas a entrarem em processo de MCP (1h STP) foram utilizadas como doadoras de núcleo, não havendo efeito negativo nas taxas de clivagem quando células utilizadas na TNS foram tratadas com STP por 12 e 24h.

Apesar de a taxa de MCP não ter sido verificada diretamente nos estádios iniciais (zigoto-2 células) dos embriões reconstruídos, especulamos que os eventos iniciais do processo de MCP, possam ter causado algum efeito na maquinaria da MCP embrionária entre o estágio de zigoto e 2-4 células, o que não ocorreu quando células em estádios mais avançados do processo de MCP foram utilizadas na TNS (12 e 24h após a STP), porém esta hipótese ainda precisa ser testada.

Com relação ao desenvolvimento ao estágio de blastocisto dos embriões clonados a partir de células em MCP, os resultados apresentaram uma variação numérica dependendo do tempo de tratamento das células doadoras ($p>0,05$).

Tanto quando as células foram tratadas com STP por 1 ou 12h, a taxa de desenvolvimento dos embriões clonados a partir de células em MCP (11,1 e 14,6%, respectivamente) foi menor em comparação aos embriões clonados a partir de células Controle (21,7 e 26,8%; $p=0,08$) e Partenogenéticos (63,8 e 43,2%; $p<0,01$) não diferindo do grupo Vivas (21,3 e 21,0%; $p>0,05$). Quando as células foram tratadas com STP por 24h, os três grupos de embriões clones não diferiram entre si ($p>0,05$), com o grupo de

embriões partenogênicos sendo superior aos grupos clonados a partir de células em MCP e Vivas ($p < 0,05$) e semelhante ao grupo Controle ($p > 0,05$).

Em resumo, levando em conta os resultados de MCP obtidos ao longo do tempo, podemos dizer que, ao contrário do que foi observado nas células, onde foi mostrada uma tendência de aumento inicial da MCP (1h) seguida de uma tendência de redução (24h), os resultados de produção de blastocistos clonados a partir destas células indicaram uma tendência de redução inicial (1h) seguida de uma tendência de aumento (24h).

Já foi mencionado que um fato discordante entre os resultados deste experimento e dos citados na literatura foi de que durante o experimento de curso-temporal, não ocorreu aumento do número de células em MCP tardia ao longo do tempo e aumento do percentual de células necróticas de acordo como era esperado e como é classicamente descrito na literatura. Além do mais mesmo após 24h de estímulo com a STP, não foi observada a fragmentação nuclear típica (Figura 20) de final da MCP e não foi observado aumento do número de células "soltas" no meio de cultivo (observação pessoal). Tais observações indicam para a ocorrência da não continuidade ou reversibilidade do processo.

Dumont *et al.* (2000), estudaram a reversibilidade do processo de MCP induzida em linfócitos T ativados mediante tratamento com STP por 2h e remoção de tratamento de morte e descreveram que quando em presença de um estímulo fraco, "mecanismos de resgate" presentes na própria célula são capazes de salvar a maioria das células do processo enquanto que em um estímulo mais forte (ou muito prolongado) estes mecanismos podem ser sobrepujados. Portanto, uma possível explicação para estas observações é que talvez o estímulo que a STP causou nestas condições foi fraco, estimulando os eventos iniciais do processo de morte (exposição da FS, por exemplo), porém insuficiente para que a célula ultrapassasse o "ponto de não-retorno" do processo o que levou a reversão e não conclusão do processo.

E esta especulação, pode explicar a tendência de melhora nos resultados de produção de blastocistos clonados a partir de células MCP tratadas por 24h em comparação ao uso de células tratadas com STP por 1h. Ou seja, a inclusão no interior do citoplasma do oócito das células que desencadearam um processo fraco de MCP, de alguma forma afetou o desenvolvimento embrionário, enquanto que, quando as células já estavam "adaptadas" ao estímulo de MCP elas foram similares as células controle não afetando o desenvolvimento embrionário.

Clodi *et al.* (2000) observaram o padrão de exposição da FS, mediante o ensaio da Anexina V em células sanguíneas oriundas de pacientes com leucemia, após o tratamento com a Fludarabina. Neste estudo, os autores subdividiram a população celular positiva para a marcação para a Anexina V, as separaram por citometria de fluxo para estudos posteriores como, por exemplo, a fragmentação nuclear e a expressão de genes pro- (Bcl-X_s e Bax) e anti-apoptóticos (Bcl-2 e Bcl-X_L). Os autores dividiram a população de células positivas, de acordo com a intensidade da marcação com a Anexina V, em Anexina-baixa (AxVlo) e Anexina-alta (AxVhi) conforme mostrado na Figura 21.

Figura 21. *Dot plot* retirado do artigo de Clodi *et al.* (2000) onde é mostrado o padrão de marcação da Anexina V (eixo vertical) ao longo da escala de tamanho celular (eixo horizontal, *forward scatter*) e os três *gates* desenhados (retângulos) utilizados para o isolamento de três subpopulações celulares. Foram separadas a subpopulação celular negativa para a marcação da Anexina V (AxVneg), a subpopulação positiva para a marcação, porém com uma baixa intensidade de fluorescência (AxVlo) e com alta intensidade de fluorescência (AxVhi).

Resumidamente, foi mostrado que a população de células AxVlo apesar de não apresentar fragmentação do DNA tinha a expressão de Bcl-X_s aumentada em comparação à expressão de Bcl-X_L e Bcl-2. A população de células AxVhi por sua vez, já apresentou fragmentação massiva do DNA e níveis não detectáveis de Bcl-X_s e Bax e níveis baixos de Bcl-2 e Bcl-X_L. Ou seja, em células no início do processo de morte (baixa intensidade de marcação com Anexina V), o “balanço” entre as proteínas pro- e anti apoptóticas nas células no início do processo de MCP está ativado e em estádios mais avançados (células com alta intensidade de marcação com a Anexina V) este mecanismo de “balanço” já não é mais importante.

Levando-se em consideração a análise do padrão de marcação com a Anexina V observado por Clodi *et al.* (2000), as observações a respeito da suspeita da não continuidade do processo de MCP e o padrão de marcação com a Anexina V observado neste experimento, pode-se especular que provavelmente o estímulo que desencadeou o processo de

MCP neste experimento foi de fato insuficiente para completar o processo de morte celular.

Diversos trabalhos já mostraram que as proteínas da família Bcl-2 estão presentes ao longo do desenvolvimento de embriões mamíferos (inclusive humanos) e estão diretamente envolvidos na sobrevivência e na ocorrência do processo de MCP nesta fase da vida (WARNER *et al.*, 1998; HARDY, 1999; BETTS e KING, 2001; JURISICOVA e ACTON, 2004). Jurisicova *et al.* (1998) mostraram que a expressão do Bcl-X_s, por exemplo, está relacionada com blastômeros mais suscetíveis à morte e ao bloqueio embrionário.

Estas observações ratificam a especulação que a redução do desenvolvimento nos embriões clones, especialmente quando foram reconstruídos com células recém tratadas com STP (baixa intensidade de marcação da Anexina V), tenha se dado provavelmente pelo fato de que neste momento o “balanço” das proteínas pró- e anti-apoptóticas estava alterado nas células doadoras de núcleo. Esta ainda é uma hipótese que precisa ser testada.

8) Resumo dos resultados

1) A STP foi eficiente em estimular um aumento do percentual de células em processo de MCP sem aumentar as taxas de morte por necrose.

2) O curso-temporal da exposição da FS (Anexina V) em diferentes momentos após o tratamento com STP mostrou um padrão de aumento seguido de redução, entretanto não foi observado o acúmulo de células em fases mais tardias de MCP ao longo do tratamento (MCP tardia/Necrose).

3) Houve um efeito do tratamento das células em MCP utilizadas para a TNS sobre a produção dos embriões clonados somente no tempo de 1h.

4) Células em MCP tratadas com STP por 1 ou 12h renderam taxas mais baixas de desenvolvimento embrionário em comparação às células em MCP tratadas por 24h.

5) Parece ter havido um efeito fraco da STP na indução do processo de morte celular gerando uma “adaptação” celular e descontinuidade da MCP desencadeado.

9) Conclusões

Conclui-se que ao contrário do esperado, houve melhora de desenvolvimento de embriões clonados a partir de células em MCP oriundas de culturas tratadas por um período prolongado de tratamento com a STP.

A observação da ausência de fragmentação nuclear dos fibroblastos ao longo do tratamento sugere que pode ter havido um estímulo insuficiente do processo de MCP neste experimento.

CAPÍTULO 4

TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE FIBROBLASTOS BOVINOS EM DIFERENTES FASES DO PROCESSO DE MCP INDUZIDO PELA ESTAUROSPORINA.

Resumo

MIRANDA, M.S. **Transferência nuclear de fibroblastos bovinos em diferentes fases do processo de MCP induzido pela estaurosporina (STP).** Tese de Doutorado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

Fibroblastos bovinos em processo de morte celular programada (MCP) podem ser reprogramados pelo oócito na técnica de transferência nuclear (TNS), porém não se sabe se isso é possível em diferentes fases de MCP. Fibroblastos com aproximadamente 60% de confluência tiveram o ciclo celular sincronizado por restrição de soro (0,5%) durante por 24h e foram tratados com 10 μ M de STP por 3h. A MCP foi analisada no citômetro de fluxo pela marcação com Anexina V ou Caspase-9 ativa. Células positivas para a Anexina (MCP/Anexina) ou para a Caspase-9 ativa (MCP/Caspase-9) foram separadas por citometria de fluxo e utilizadas na TNS. Células não coradas e não separadas no citômetro serviram como controle (Controle). A taxa de fusão dos grupos foi avaliada e os embriões fundidos foram cultivados em meio SOF (5% de CO₂) sendo avaliados com relação à clivagem (2º dia de cultivo) e formação de blastocisto (7º dia). Células remanescentes da micromanipulação foram avaliadas quanto à fragmentação nuclear mediante a coloração com Hoechst 33342 (10 μ g/mL), replaqueadas em DMEM 10% de SFB sem STP e reavaliadas quanto à fragmentação nuclear 24h depois do replaqueamento. Os resultados de desenvolvimento embrionário e o percentual de fragmentação nuclear das células foram analisados pelo teste de χ^2 adotando-se nível de significância de 5%. Não houve influência do uso de células em MCP sobre as taxas de fusão e clivagem embrionária ($p>0,05$). O uso de células MCP/Caspase-9 para a TNS reduziu ($p<0,05$) a taxa de blastocisto comparado ao uso de células MCP/Anexina (12,3 vs. 26,4%). Apesar de não significativa ($p>0,05$), o uso de células MCP/Caspase-9 reduziu em 53,7% a produção de blastocistos em relação à taxa das células Controle (22,9%). Um baixo percentual de fragmentação nuclear foi observado nas células MCP/Anexina no momento da TNS (6,5%) seguido de aumento para 14,3% ($p<0,05$) 24h depois do replaqueamento. Nas células MCP/Caspase-9, observou-se percentual elevado de fragmentação nuclear no momento da TNS (39,8%) seguido de aumento para 63,3% ($p<0,05$) 24h depois do replaqueamento. Em conclusão, o uso de células MCP/Caspase-9 afetou o desenvolvimento embrionário em função do percentual elevado fragmentação nuclear no momento da TNS e células MCP/Anexina não afetaram o desenvolvimento por apresentarem grande capacidade de reversibilidade do processo de morte independentemente da sua transferência para os oócitos.

Palavras-chave: transferência de núcleo, MCP, Anexina V, Caspase-9 ativa, fibroblastos, STP, separação celular.

Abstract

MIRANDA, M.S. **Nuclear transfer (NT) with bovine fibroblasts at different phases of programmed cell death (PCD) process stimulated with staurosporine (STP).** *PhD. Thesis – Animal Science and Food Engineering Faculty, University of Sao Paulo, Pirassununga, 2009.*

Bovine fibroblasts can be reprogrammed even in the process of programmed cellular death (PCD) by nuclear transfer (NT). However, it is not known the effect of cells in different phases of the cell death process. Fibroblasts with 60% of confluency were synchronized by serum starvation (0.5%) for 24h and treated with 10 μ M of STP for 3h. Cells in PCD was detected by the use either Annexin V or active Caspase-9 assay for live cells. Either Annexin positive (PCD/Annexin) or Caspase-9 active positive cells (PCD/Caspase-9) were sorted by flow cytometry and fused to enucleated oocytes. Untreated, unstained, unsorted cells served as control (Control). Fusion rate was recorded and successfully fused embryos were cultivated in SOF medium (5% CO₂ incubator). Cleavage (on day 2) and blastocyst rates (on day 7) were evaluated. In order to evaluate PCD progression, remaining cells from micromanipulation were stained with Hoechst, analyzed for nuclear fragmentation and re-plated in regular cell culture medium without STP. Cells were stained again and nuclear fragmentation was analyzed 24h after. Embryonic developmental data and percent of nuclear fragmentation were analyzed with Chi-square test ($p < 0.05\%$). There was no effect on fusion and cleavage rates ($p > 0.05$). PCD/Caspase-9 cells showed reduced blastocyst production when used for NT compared with PCD/Annexin cells ($p < 0.05$). Despite no statistically different ($p > 0.05$), PCD/Caspase-9 cells showed a 53.7% decrease in blastocyst yield compared with Control cells. PCD/Annexin cells showed similar results compared with Control cells ($p > 0.05$). Cell analysis showed that 6.5% of PCD/Annexin cells had nuclear fragmentation at the moment of NT (6.5%). These cells had a good reversibility potential once since only 14.3% showed nuclear fragmentation 24h after re-plating in medium without STP. Conversely, PCD/Caspase-9 cells had a high frequency of nuclear fragmentation at the moment of NT (39.8%) followed by an increase to 63.3% after re-plating. In conclusion, the use of cells in PCD with Caspase-9 active impaired blastocyst production probably because of high nuclear fragmentation frequency in these cells at the moment of NT. The use of PCD/Annexin cells for NT did not affect blastocyst production probably due cell is able to revert PCD even without its transfer to oocyte cytoplasm.

Key-words: nuclear transfer, PCD, Annexin, Caspase-9 active, fibroblasts, STP, cell sorting.

1) Introdução

A produção de animais pela técnica de TNS animal tem muitas aplicações importantes na pesquisa básica, medicina e agricultura. Diferentes espécies animais como ovelhas (SCHNIEKE *et al.*, 1997; WILMUT *et al.*, 1997), cabras (BAGUISI *et al.*, 1999), camundongos (WAKAYAMA *et al.*, 1999), porcos (POLEJAEVA *et al.*, 2000), bovinos (CIBELLI *et al.*, 1998; KATO *et al.*, 1998; WELLS *et al.*, 1999), gatos (SHIN *et al.*, 2002), coelhos (CHESNE *et al.*, 2002), cavalos (GALLI *et al.*, 2003), cachorros (LEE *et al.*, 2005) e búfalos (SHI *et al.*, 2007) já foram clonadas com sucesso a partir de células somáticas adultas.

Como descrito por Vajta e Gjerris (2006), considerando-se a perfeição com a qual o material genético é manipulado no processo normal de desenvolvimento dos gametas e posterior fecundação, é simplesmente um “milagre” que a intrusão drástica do material genético de uma célula somática no interior de um oócito enucleado ainda resulte em desenvolvimento embrionário, fetal e gere indivíduos vivos.

Portanto, há no interior do oócito maduro fatores ainda desconhecidos que são responsáveis pela reprogramação nuclear os quais possibilitam a remoção do padrão epigenético da célula doadora e o restabelecimento do padrão epigenético embrionário favorecendo o desenvolvimento embrionário adequado (YANG *et al.*, 2007). Isto pode ser exemplificado por diversos relatos nos quais o oócito mostrou ser capaz de reprogramar uma variedade de tipos celulares em vários graus de diferenciação e estados fisiológicos (revisto por OBACK e WELLS, 2007). Até mesmo células ovinas tratadas com temperaturas supra fisiológicas (LOI *et al.*, 2002) ou pró-núcleos tratados com peróxido de hidrogênio (LIU e KEFEE, 2000) foram reprogramados depois de transferidos para o interior do oócito enucleado, o que demonstra a grande capacidade de remodelação e reprogramação nuclear presente no interior do citoplasma do oócito.

Apesar dessa grande capacidade, diversas falhas no mecanismo de reprogramação do oócito podem ocorrer uma vez que a eficiência final da técnica gira em torno de 5% (HEYMAN, 2005).

Além do mais, alguns estudos têm sugerido que há um efeito negativo do estado fisiológico da célula doadora nas fases posteriores do processo. Jang *et al.* (2004) relataram efeito da idade da célula doadora de núcleo (repiques) sobre a ocorrência da morte celular programada (MCP) dos embriões clones. Park *et al.* (2004) reportaram que o tratamento das células doadoras com inibidores de MCP melhorou a qualidade dos embriões clonados que foram produzidos.

A MCP é um processo de eliminação de células excedentes ou geneticamente comprometidas. Este processo envolve uma série de rotas metabólicas que levam a modificações substanciais na célula conduzindo para morte (BOSCO *et al.*, 2005). São sinais morfológicos a condensação da cromatina, fragmentação da cromatina, perda de adesão e arredondamento celular (células aderentes) e fragmentação do citoplasma com formação de *blebbings*. E bioquimicamente, são observadas a externalização do fosfolípido de membrana FS (MARTIN *et al.*, 1995), clivagem proteolítica de um número variado de substratos por proteases denominadas de caspases (MARTIN e GREEN, 1995) e a condensação nuclear seguida pela hidrólise internucleossomal do DNA formando fragmentos múltiplos de 200 pares de base (ZIMMERMAN *et al.*, 2001).

Em vários modelos já bem estudados a MCP pode ser dividida em quatro fases: estímulo, sinais, reguladores e efetores. Mesmo as células em processo de morte estando engajadas, o processo pode ser revertido antes de atingir estádios mais avançados (MORITA e TILLY, 1999), ou seja, antes de passar pelo chamado “ponto de não retorno” do processo. Porém, esta etapa do processo ainda não foi especificamente definida (KROEMER *et al.*, 2009).

A redistribuição da FS na membrana plasmática celular é um evento inicial do processo de MCP que pode ser estudado em células vivas mediante o uso da proteína chamada Anexina V (conjugada com um fluoróforo) (MARTIN *et al.*, 1995) e que, portanto pode ser utilizado nos estudos de reversibilidade do processo de MCP. Clodi *et al.* (2000) estudaram a exposição da FS de células sanguíneas tratadas com um agente indutor de MCP mediante o ensaio da Anexina V (conjugada com o FITC) e mostraram que em células positivas, porém com baixa fluorescência, o processo de morte pôde ser revertido após o replaqueamento.

Span *et al.* (2002) também mostraram que a detecção da FS na membrana plasmática não é sempre associada com MCP inevitável uma vez que células com a exposição do fosfolipídio que foram separadas por citometria de fluxo e replaqueadas mantiveram a capacidade proliferativa.

Neste experimento foi avaliada a reversibilidade do processo de MCP em fibroblastos bovinos, detectada pela exposição da FS, mediante a sua utilização como doadores de núcleo na técnica de transferência nuclear. Adicionalmente este modelo experimental foi utilizado para avaliar a reversibilidade do processo de morte em fibroblastos positivos para um marcador mais avançado do processo, a Caspase-9 ativa.

2) Justificativa

No experimento anterior, especulamos sobre um sinal fraco de indução da MCP que apesar de ter estimulado as células a entrarem em processo de morte celular, não foi suficiente para que as células ultrapassassem o chamado “ponto de não-retorno” o que garantiu a manutenção da sobrevivência e a não finalização do processo de morte.

Sendo assim, ainda há a necessidade de verificação do limite da reversibilidade do processo de MCP neste modelo utilizando a técnica de TNS animal, em um protocolo de indução suficientemente forte para induzir o completo processo de MCP. Para tanto, foi avaliado também o uso de células, para a TNS animal, em estádios mais avançados do processo de MCP como, por exemplo, células com a Caspase-9 ativada.

3) Hipótese Experimental

Células em processo de MCP, com exposição da FS ou com atividade da Caspase-9, podem ser reprogramadas quando utilizadas como doadoras de núcleo na técnica de TNS animal.

4) Objetivos

4.1) Geral

Verificar a possibilidade de reprogramação, pelo oócito bovino, de fibroblastos em duas fases diferentes do processo de MCP. Fibroblastos com a exposição da FS e com a Caspase-9 ativa.

4.2) Específicos

4.2.1) Nas Células Somáticas

1) Mediante um experimento dose-resposta, determinar o tratamento com STP mais eficaz na indução da MCP de fibroblastos bovinos se baseando no ensaio da Anexina V.

2) Uma vez escolhido a dose do tratamento, determinar o curso-temporal do processo de MCP, mediante a análise de dois marcadores do processo ao longo do tempo: Anexina V e Caspase-9 ativa.

3) Fazer a separação celular por citometria das células identificadas como positivas para os marcadores do processo de MCP mencionados e utilizá-los como doadores de núcleo na TNS animal.

4) Verificar a continuidade do processo de MCP das células separadas de acordo com a marcação da Anexina V e da Caspase-9 ativa mediante o replaqueamento de uma amostra das células separadas pelo citômetro em meio de cultivo sem a presença da STP.

4.2.2) Nos Embriões Reconstituídos

1) Analisar e comparar as taxas de fusão, clivagem e posterior desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto dos embriões produzidos com fibroblastos em processo de MCP positivos para cada um dos marcadores de MCP propostos.

2) Verificar o número de células total e a ocorrência da MCP nos blastômeros dos embriões clones produzidos mediante a técnica de TUNEL.

3) Analisar a expressão dos genes Oct-4 e Interferon- τ nos embriões clones produzidos e comparar o nível de expressão destes genes com embriões fecundados *in vitro*.

5) Material e Métodos

5.1) Obtenção e Manutenção das Culturas de Fibroblastos.

As células somáticas doadoras de núcleo foram obtidas a partir de biópsias realizadas de fêmea adulta. A biópsia foi retirada da prega da cauda do animal e transportada imediatamente para o laboratório em solução tampão fosfato (PBS) em gelo. O tecido foi então triturado em pequenos pedaços de aproximadamente 1 mm, lavados em PBS e fixados numa placa de Petri de 35 mm de diâmetro. O cultivo procedeu-se em meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), piruvato (22 $\mu\text{g/mL}$), glutamina (1mM) e gentamicina (50 $\mu\text{g/mL}$). A incubação foi realizada a uma temperatura de 38,5°C e atmosfera gasosa de 5% CO_2 em ar, trocando-se o meio a cada três dias.

Após o crescimento das primeiras células, o meio foi substituído por DMEM suplementado com 10% de SFB e o cultivo processado até a 3ª passagem, momento no qual as células foram criopreservadas em nitrogênio líquido em meio DMEM suplementado com 20% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Durante a realização dos experimentos, amostras de células foram descongeladas mantidas em DMEM com 10% de SFB até o momento da utilização nos experimentos. Foram utilizadas nos experimentos células entre a 4ª e a 10ª passagens.

5.2) Protocolo de Sincronização do Ciclo Celular.

De acordo como determinado no primeiro experimento, os fibroblastos oriundos de culturas não confluentes, foram plaqueados em garrafas de 25cm² (60% de confluência) em DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24h do plaqueamento, o meio foi substituído por DMEM suplementado com 0,5% de SFB (restrição de SFB) no qual as culturas permaneceram por 24h.

Em seguida as células foram induzidas ou não a entrarem em MCP de acordo com os experimentos propostos.

5.3) Determinação da Concentração de Estaurosporina (STP) utilizada para a Indução da MCP (Experimento Dose-Resposta).

Após o protocolo de sincronização do ciclo celular, os fibroblastos foram tratados com 0,1, 1, 10 e 50 μ M de STP (Sigma) por 24h. Para este experimento, foi adquirida uma nova STP (Sigma) que foi diluída em DMSO e armazenada a 4 °C, de acordo como indicado pelo fabricante.

Após o tratamento, a MCP foi determinada por citometria de fluxo FACSAria (BD Bioscience) mediante a marcação da exposição da fosfatidilserina pela técnica da Anexina V (Apoptest-FITC; Nexins Research, Hoeven, Holanda), para tanto as células foram tripsinizadas e ressuspensas em tampão de ligação (fornecido no kit) contendo Anexina V (10 μ g/mL) por 15 minutos protegidas da luz. Após a coloração com a Anexina, as células foram coradas com Iodeto de propídeo (1 μ g/mL) e imediatamente analisadas por citometria de fluxo.

Foram avaliadas 5.000 células por amostra em cada repetição sendo que o experimento foi repetido 3 vezes. Foi calculada pelo citômetro a

distribuição percentual das quatro categorias de células: células em processo de MCP (marcadas somente com a Anexina), vivas (com nenhuma marcação), necróticas (marcação somente para iodeto de propídeo) e em processo de MCP tardio (marcadas tanto para a Anexina quanto para o iodeto de propídeo). Um grupo de células não coradas foi utilizado para o ajuste da fluorescência basal (*background*).

A dose de STP escolhida foi a que apresentou maiores taxas de MCP com as menores taxas de necrose, de modo a garantir uma indução mais específica da MCP em si. A STP foi utilizada na proporção 1:1000 a partir de um estoque diluído em DMSO e para cada repetição, foi determinada a taxa de MCP de uma cultura de células tratadas apenas com DMSO (Controle).

5.4) Determinação do curso temporal de dois marcadores do processo de MCP: exposição da FS e Caspase-9 ativa.

Após a determinação da concentração de STP a ser utilizada, os fibroblastos foram tratados com 10 μ M de STP por 3, 12 e 18h. Ao final de cada tempo de tratamento, foi avaliada a progressão de dois marcadores do processo de MCP por citometria de fluxo (BD – FACSAria).

A detecção da exposição da FS foi feita mediante o uso da técnica da Anexina V, que seguiu a mesma metodologia descrita no experimento dose-resposta. Para a detecção da Caspase-9 ativa, foi utilizado o kit *FLICA Apoptosis Detection Kit Caspase Assay* (Immunochemistry Technologies, LCC) seguindo-se a recomendação do fabricante. Basicamente as células foram ressuspendidas em 150 μ L de DMEM com 0,5% de SFB, coradas por 1h a 38,5 °C, em seguida lavadas por centrifugação com tampão fornecido pelo kit e analisadas em citômetro de fluxo. As células com Caspase-9 ativas fluoresceram em verde e, portanto, assim como no ensaio da Anexina V, o iodeto de propídeo foi adicionado (1 μ g/mL) de modo identificar as células

em MCP tardia (positivas para Caspase-9 e iodeto de propídeo) e células em necrose.

5.5) Produção dos Embriões Clonados

5.5.1) Maturação *in vitro* dos oócitos bovinos

Ovários de vacas zebus ou mestiças foram obtidos em abatedouro, transportados em solução salina (0,9%) a 37°C, e encaminhados até o laboratório. Os complexos *cumulus*-oócito foram aspirados de folículos entre 2 a 8 mm utilizando uma seringa de 10 mL acoplada a uma agulha de 18 G, e somente os oócitos de qualidade I, com *cumulus* compacto completo e citoplasma límpido e de aspecto homogêneo (finas granulações), foram selecionados para os experimentos. Os oócitos foram, em seguida, maturados em TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃ suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), piruvato (22 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), 0,5 µg de FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1 µg de estradiol/mL em microgotas de 100 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral (15 oócitos/gota). A incubação foi realizada a uma temperatura de 38,5°C e atmosfera gasosa de 5% CO₂ em ar durante 18 h.

5.5.2) Transferência nuclear – Seleção do corpúsculo polar e enucleação dos oócitos.

Após 18h do início da maturação, as células do *cumulus* foram removidas por exposição à solução de hialuronidase (2 mg/mL) em PBS simples acrescido de 0,4% de BSA e os oócitos foram selecionados pela presença do 1º corpúsculo polar. Em seguida, foram transferidos para uma solução de citocalasina B (10 µg/mL) e Hoechst 33342 (10 µg/mL) em meio

SOF (VAJTA *et al.*, 1999) suplementado com 2,5% de SFB e 0,5% de albumina sérica bovina BSA durante 15 minutos.

Após a seleção e coloração, os oócitos foram transferidos para a gota de micromanipulação com meio HEPES-SOF (WELLS *et al.*, 1999) suplementado com 7,5 µg/mL de citocalasina B sob microscópio invertido (Leica - Germany) equipado com sistema de luz ultravioleta e micromanipuladores (Narishige - Japão). Os oócitos foram então enucleados, removendo uma pequena porção do citoplasma próxima à região do 1º corpúsculo polar (eliminação do material genético do oócito). Esta porção aspirada foi visualizada sob luz ultravioleta para confirmação da enucleação. Após a enucleação, todos os oócitos foram recolocados em meio SOF e retornaram para a estufa de cultivo.

5.5.3) Transferência nuclear – Separações celulares (*cell sorting*) e reconstrução embrionária com as células em processo de MCP.

Após a enucleação de todos os oócitos, os fibroblastos foram tripsinizados, divididos em dois grupos, corados e analisados no citômetro quanto à ocorrência da MCP pela marcação da Anexina V ou da Caspase-9 ativa. Em seguida, foi realizada a separação citométrica das populações celulares (FACS - *fluorescence activated cell sorting*) de acordo com o padrão de marcação da Anexina V e da Caspase-9. Foram preparados tubos de 15 mL com DMEM suplementado com 0,5% de SFB e foram separadas as populações de células (1) Anexina positivas / iodeto de propídeo negativas e (2) Caspase-9 positivas/iodeto de propídeo negativas, sendo 1.000 - 3.000 células de cada.

Neste experimento, assim como no anterior, foram desenhados dois novos “*gates*” dentro dos quadrantes das categorias Anexina positivas e Caspase-9-positivas no momento da separação das células (Figura 22). Esta

metodologia objetivou garantir uma maior segurança e pureza das populações de células separadas pelo citômetro.

Figura 22. *Dot plots* gerados pelo citômetro de fluxo nos quais é mostrado o padrão de leitura da marcação das células pela Anexina V ou Caspase-9 (eixo X) e iodeto de propídeo (eixo Y) e os respectivos quadrantes gerados. (A) *Dot plot* da análise das células coradas com a Anexina V e o iodeto de propídeo, mostrando os quadrantes e o *gate* desenhado (Separadas) para a separação celular; (B) *Dot plot* da análise das células coradas com a Caspase-9 e o iodeto de propídeo mostrando os quadrantes e o *gate* desenhado (Separadas) para a separação celular.

Após a separação as células foram centrifugadas e transferidas para a gota de micromanipulação juntamente com os oócitos previamente enucleados. Uma única célula foi então inserida no espaço perivitelíneo de cada um dos oócitos perfazendo dois grupos experimentais de embriões reconstruídos: MCP/Anexina V (reconstruídos com células Anexina V positivas) e MCP/Caspase-9 (reconstruídos com células Caspase-9 positivas).

Outro cultivo celular foi preparado da mesma forma e as células deste cultivo foram passadas pelo citômetro e utilizadas para a reconstrução de alguns embriões (Grupo Controle). A etapa da transferência das células somáticas dos três grupos experimentais não ultrapassou o tempo total de 1h.

Os conjuntos oócitos-células somáticas foram eletricamente fundidos 24 h após o início da maturação em uma solução contendo 0,3 M de manitol, 0,1 mM $MgSO_4$, 0,5 mM Hepes e 0,05% BSA. Os embriões reconstruídos foram alinhados manualmente de maneira que a superfície de contato entre o oócito e a célula estava paralela aos eletrodos. As células foram, então, expostas a dois pulsos elétricos de 2,25 kV/cm durante 45 μ seg. Aproximadamente uma hora e meia após a eletrofusão (completando 26h após o início da maturação), a taxa de fusão foi avaliada e os oócitos fundidos foram quimicamente ativados em 5 μ M de Ionomicina durante 4 minutos e, em seguida, cultivados em meio SOF com 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6DMAP) durante 3h.

Ao término do período de ativação, os oócitos foram cultivados em meio SOF suplementado com 2,5% de SFB, 0,5% de BSA e co-cultivo com células da granulosa da maturação. O cultivo foi em estufa com temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% CO_2 , em ar, durante sete dias. No segundo dia de cultivo, os embriões foram avaliados quanto à taxa de clivagem e no sétimo dia de cultivo, os embriões foram: metade fixada para a análise da taxa de MCP embrionária e metade estocados em freezer - 80°C para análise da expressão gênica.

Em todos os experimentos onde foram produzidos os embriões clones, foram também produzidos embriões partenogenéticos que serviram como controle da qualidade do processo de ativação e das condições de cultivo *in vitro*.

5.6) Morfologia nuclear das células MCP/Anexina e MCP/Caspase-9 utilizadas na reconstrução embrionária e 24h após replaqueamento.

Logo em seguida à etapa de transferência das células separadas para cada marcador de MCP no espaço perivitelíneo dos oócitos enucleados, um grupo de células remanescentes da gota de micromanipulação foi selecionado de acordo com os mesmos critérios e com a própria micropipeta de injeção utilizada na TNS, e transferidas para novas gotas individuais (50 µL) de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina.

As células foram imediatamente coradas com Hoechst 33342 (10 µg/mL) por 10 minutos, visualizadas em microscópio de fluorescência (Leica, Germany) e fotografadas mediante uma curta exposição à luz U.V (menos de 10s). Em seguida o meio foi renovado para a remoção do Hoechst (com cuidado para não remover as células) e as células foram cultivadas em estufa de CO₂ por mais 24h sem a STP.

Após este período as células foram novamente coradas com o Hoechst de acordo como já descrito, visualizadas e fotografadas em microscópio de fluorescência.

5.7) Análise da MCP nos Embriões Clones.

Os embriões destinados para a análise da taxa de MCP foram fixados no sétimo dia de cultivo em paraformaldeído 3,7% em PBS e armazenados a 4°C até o momento da análise. Para a análise, os embriões foram lavados quatro vezes em PBS contendo 3mg/mL de álcool polivinílico (PBS-PVA), permeabilizados em PBS contendo 0,1% (v/v) de Triton X-100 por 1h. Em

seguida lavados três vezes em PBS-PVA e incubados com as dUTPs conjugadas com fluoresceína e com a enzima TdT (reagentes do kit TUNEL; Roche Diagnostics, Tokio) por 1h a 37°C. Controles positivos (um ou dois embriões) foram incubados com 1000UI/mL de desoxirribonuclease (DNAse I; Sigma) por 1h a 37°C e lavados três vezes em PBS-PVA. Controles negativos (um a dois embriões) foram incubados por 1h com as dUTPs conjugadas com a fluoresceína, na ausência da enzima TdT. Após a reação de TUNEL os embriões foram corados com Hoechst (5µg/mL) para a visualização dos núcleos embrionários (em azul). Os embriões foram montados entre lamina e lamínula e analisados em microscópio de fluorescência, sendo que os núcleos que apresentaram a coloração verde foram considerados apoptóticos. Foi anotado o percentual de MCP de cada embrião (número de núcleos verdes entre o total de núcleos azuis).

5.8) Produção dos Embriões Fecundados *in vitro*.

A produção *in vitro* de embriões, técnica realizada rotineiramente no laboratório, procedeu-se a partir de oócitos viáveis maturados *in vitro* (MIV), fecundados com espermatozóides capacitados *in vitro* (FIV) e mantidos de zigoto até o estágio de blastocisto em sistema de co-cultivo *in vitro*. Para tanto, ovários de vacas zebras ou mestiças foram obtidos em abatedouro, transportados em solução salina (0,9%) a 37°C, e encaminhados até o laboratório. Complexos *cumulus*-oócito foram aspirados de folículos entre 2 a 8 mm e somente os oócitos de qualidade I, com *cumulus* compacto completo e citoplasma límpido e de aspecto homogêneo (finas granulações), foram selecionados e maturados em meio TCM199 com sais de Earle, glutamina e NaHCO₃ suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), piruvato (22 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), 0,5 µg de FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1 µg de estradiol/mL em microgotas de 100 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral (15 oócitos/gota). A incubação foi

realizada a uma temperatura de 38,5°C e atmosfera gasosa de 5% CO₂ em ar, durante 22 a 24 h.

Após o período de maturação, os oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro*, em microgotas de 100 µL de meio TALP suplementado com heparina (10 µg/mL), piruvato (22 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), BSA sem ácidos graxos (6 mg/mL) e solução de PHE (2 µM de penicilamina, 1 µM de hipotaurina e 0,25 µM de epinefrina). O sêmen de um touro da raça Nelore foi descongelado e centrifugado em gradiente de Percoll (45 e 90%) para obtenção dos espermatozóides móveis, além da remoção do diluidor e do plasma seminal. A concentração espermática utilizada foi de 2 x 10⁶ células/mL e, após 30 minutos de incubação dos espermatozóides, os oócitos foram transferidos para as microgotas (30 oócitos/gota) e foram co-incubados em atmosfera com 5% de CO₂ em ar, temperatura de 38,5°C durante 18 h.

Após o processo de MIV e FIV, os zigotos tiveram as células do *cumulus* removidas e foram cultivados em meio SOF (VAJTA *et al.*, 1999) suplementado com 2,5% de SFB e 0,5% de BSA, em co-cultivo com células da granulosa em estufa a temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% CO₂ em ar, durante sete dias, quando foram retirados do cultivo e armazenados individualmente para posterior análise de expressão gênica.

5.9) Produção dos embriões partenogênicos.

Em todos os experimentos onde foram produzidos os embriões clones, foram também produzidos embriões partenogênicos que serviram como controle da qualidade do processo de ativação e das condições de cultivo *in vitro*. Para tanto, em cada repetição, um grupo de oócitos não micromanipulados foram ativados em 5 µM de Ionomicina durante 4 minutos e, em seguida, cultivados em meio SOF com 2 mM de 6-dimetilaminopurina

(6DMP) durante 3h. Após a ativação os embriões foram cultivados em meio SOF e avaliados de acordo como descrito para os embriões clonados.

5.10) Análise da expressão gênica dos embriões.

No sétimo dia de cultivo blastocistos, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos clonados e fertilizados *in vitro*, foram armazenados individualmente em solução de PBS simples acrescido de 0,1% de polivinilpirrolidona (PVP) e 1 unidade/ μ L de inibidor de RNase. Imediatamente foram mergulhados em nitrogênio líquido e armazenados no freezer -80°C para posterior análise da expressão gênica.

O RNA dos blastocistos foi extraído utilizando-se o kit Trizol® de acordo com as sugestões do fabricante com algumas modificações. Cada embrião foi retirado do freezer e homogeneizado em 100 μ L do reagente Trizol® (Invitrogen, Brasil) e 5 μ g/mL de acrilamida linear (Ambion). Após adição de 20 μ L de clorofórmio e centrifugação, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo e o RNA precipitado por centrifugação na presença de álcool isoamílico. O *pellet* de RNA foi então lavado com 1 mL de etanol 75%, secado à temperatura ambiente, e por fim eluído em água livre de RNase.

Imediatamente após a extração do RNA, as amostras foram submetidas à síntese do DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa utilizando-se o kit *ImProm-IITM Reverse Transcriptase* (Promega, Madison, WI, EUA). Para tanto, os microtubos contendo os embriões foram incubados por 5 minutos a 70°C com 0,5 μ L de oligo-dT (0,5 μ g/ μ L) e 0,5 μ L de água livre de RNase, e imediatamente resfriados a 4°C para a adição de 2,5 μ L de tampão de reação 5x, 0,5 μ L da enzima transcriptase reversa, 0,5 μ L de dNTPs (10mM de cada), 0,5 μ L de RNase OUT (1U/ μ L – Invitrogen) em um volume final de 10 μ L. As amostras foram aquecidas a 42°C por 1 h e a seguir a 70°C por 15 min. O cDNA foi armazenado a -20°C até o uso.

Os transcritos de interesse foram quantificados a partir do cDNA produzido utilizando um ensaio de quantificação relativa por PCR em tempo real (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems). Em todas as reações de PCR foi utilizado o corante ROX como referência passiva e para detecção do DNA o corante SYBR Green (Power SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems). Os transcritos amplificados foram a histona H2A (H2A), o interferon- τ (INF- τ) e o OCT-4 (OCT). As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (Prodinol, Brasil) utilizados para amplificação destes transcritos estão descritas na Tabela 7.

As amplificações dos transcritos estudados foram previamente ajustadas ou testadas quanto à concentração de *primers* e, especificidade e eficiência de amplificação. As condições de termociclagem incluíram um passo inicial de 95°C por 10 minutos e, 45 ciclos de 95°C por 30 s e 60°C por 1 min. Foram utilizados 0,1 μ M, 0,20 μ M e 0,20 μ M de cada par de oligonucleotídeos iniciadores para a H2A, o INF- τ e o OCT-4, respectivamente.

Cada transcrito foi amplificado individualmente utilizando-se o kit Power SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems) num volume final de reação de 20 μ L. Para cada amostra, o cDNA foi diluído 1:8 vezes para ser utilizado nas reações. Todos transcritos de uma mesma amostra foram amplificados numa mesma reação de PCR. A eficiência de amplificação de cada transcrito foi estimada em triplicada utilizando-se uma curva-padrão construída por diluição serial do cDNA (1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256).

A quantidade relativa em cada amostra de cada transcrito de interesse (OCT-4 e INT) foi corrigida pela quantidade de controle endógeno (H2A) da mesma amostra utilizando-se o método da curva padrão conforme sugestão do fabricante do equipamento (Applied Biosystems).

Tabela 7 – Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação relativa dos genes, o tamanho do fragmento e seu respectivo código de acesso no GenBank.

Gene	Espécie	Seqüência (5'- 3')	Tamanho (pb)	GenBank
Oct – 4	Bovino	GGTCTCTTTGGAAAGGTGTC	314	NM 174580.
		ACACTCGGACCACGTCCTTC		
H2A	Bovino	AAAGCGTATTACCCTCGTCA	166	BC 109743
		GAATCCAGGCATCCTTAGACAG		
INF- τ	Bovino	TGCCTGGAACACCACCCTC	167	X 65539
		AGG TAG ACA TGG ATA CCC TGG AAG		

5.11) Análise Estatística

Todos os dados referentes às análises celulares foram transformados para Arco-Seno e analisados pela ANOVA adotando-se o nível de significância de 5%. Quando necessário, foi utilizado pós-teste de Bonferroni.

Para os dados referentes à análise do desenvolvimento embrionário e do número de células com fragmentação nuclear após replaqueamento, foi utilizado o teste do X^2 adotando-se níveis de significância de 5%. O nível de significância de 10% foi adotado somente quando mencionado.

Os valores percentuais referentes aos núcleos embrionários em MCP (TUNEL) e o número de células total embrionário foram também analisados pela ANOVA adotando-se o nível de significância de 5%. Quando necessário, foi utilizado pós-teste de Bonferroni.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software BioEstat 4.0 (AYRES *et al.*, 2005).

6) Resultados

6.1) Determinação da concentração de STP utilizada para a Indução da MCP.

O tratamento com a STP por 24h foi eficaz em induzir a MCP dos fibroblastos como pôde ser observado pela alteração morfológica das células em cultivo e pelos resultados positivos da marcação com a Anexina V.

Neste experimento, pode ser observado (Figura 23) que de acordo com o aumento da concentração da STP, houve um aumento do percentual de células em MCP tardia que chegou a atingir valores de 70,8 e 79,4% nas concentrações de 10 e 50 μ M, respectivamente. O que significa que essas duas concentrações de STP foram eficientes em induzir a MCP na maioria dos fibroblastos tratados.

Figura 23. Resultados do experimento para determinação da concentração de STP. Fibroblastos foram tratados com STP por 24h e analisados por citometria de fluxo quanto à marcação com a Anexina V e iodeto de propídeo.

O objetivo deste experimento foi escolher uma concentração de STP que apresentasse uma alta taxa de MCP sem aumentar sobremaneira a taxa de Necrose. Neste sentido, uma vez que as concentrações de 10 e 50µM terem apresentado resultados semelhantes com relação ao acúmulo de células em MCP tardia/Necrose ($p>0,05$), optou-se por escolher a concentração de 10 µM para a continuação dos experimentos.

6.2) Determinação do curso temporal de dois marcadores do processo de MCP: exposição da FS (Anexina V) e a ativação da Caspase-9.

Este experimento foi repetido três vezes e os tempos avaliados foram os de 3h, 12 e 18h após o tratamento com a STP. Os resultados dos dois marcadores são mostrados na Figura 24.

Figura 24. Resultados do experimento de curso-temporal da Anexina V e da Caspase-9 em fibroblastos tratados com 50 μ M de STP por 3, 12 e 18h.

Observou-se que 3h após o tratamento da STP, houve um aumento significativo do percentual de células em MCP, com a marcação da Anexina (89,8%; MCP/Anexina positivas), enquanto que no mesmo momento, apenas 24,9% das células estavam positivas para a marcação da Caspase-9 ativa (MCP/Caspase-9-positivas).

Às 12h após o início do tratamento com a STP observou-se um decréscimo no percentual de células em MCP/Anexina positivas (65,9%) e um aumento do percentual de células em MCP tardia pela técnica da Anexina V (27,6%). O percentual de células em MCP/Caspase-9-positivas também aumentou neste momento (30,6%) assim como o percentual de MCP tardia avaliado pelo método da Caspase-9 (21,6%).

As 18h após o tratamento o percentual de células em MCP tardia na análise da Anexina V, superou o percentual de células em MCP/Anexina positivas (57,7 vs 39%). Com relação à Caspase-9 ativa, os valores das células em MCP/Caspase-9-positivas e MCP tardia foram similares (36,7 vs 39,4%). Vale notar que neste tempo de tratamento os valores de MCP/Anexina positivas e MCP/Caspase-9-positivas se igualaram (39 vs 36,7%).

A análise da fragmentação nuclear mediante a coloração com o corante Hoechst 33342 (10 µg/mL) confirmou que o processo de MCP se deu de forma completa uma vez que já 6h após o estímulo da STP, praticamente 100% dos núcleos apresentavam a sua cromatina com padrão de fragmentação típico de MCP (Figura 25).

Figura 25. Fotomicrografias da morfologia nuclear de fibroblastos bovinos tratados com 10 μ M de STP em diferentes tempos. Os fibroblastos foram corados com 10 μ g/mL de Hoechst 33342 e analisados em microscópio de fluorescência. Um grupo de células não tratadas serviu como Controle. Aumento de 100X.

Em resumo, observou-se que a STP induziu especificamente o processo de MCP uma vez que as taxas de necrose se mantiveram baixas ao longo do tempo e houve uma progressão clara do processo de MCP, já que as células em MCP tardia foram se acumulando ao longo do tempo.

6.3) Produção dos Embriões Clonados – Uso de células em diferentes fases da MCP.

Uma vez que pela análise da morfologia nuclear, quase a totalidade das células sofreram fragmentação nuclear típica de MCP com 6h após o início do tratamento com 10 μ M. Foi decidido avaliar um tempo anterior de tratamento, antes que a fragmentação do DNA tenha ocorrido para que estas células fossem utilizadas como doadoras de núcleo na técnica de TNS a fim de observarmos a continuidade do processo de morte neste modelo assim como após o replaqueamento das células separadas por citometria.

Após 3 h de tratamento com 10 μ M de STP foi observado pela análise da morfologia nuclear, que as células ainda não haviam sofrido a fragmentação nuclear verificada tanto pela coloração com o Hoechst 33342 (10 μ g/mL) quanto com a técnica de TUNEL (Figura 26).

Figura 26. Fotomicrografias de fibroblastos bovinos tratados com 10 μ M de STP por 3h submetidos à técnica de TUNEL. Os núcleos TUNEL-positivos foram corados em verde (A'- D') e o Hoechst 33342 (10 μ g/mL) foi utilizado para corar todos os núcleos das células (A-D). (A, A') controle negativo da técnica. (B, B') controle positivo da técnica. (C, C') células Controle não tratadas com STP. (D, D') células tratadas com 10 μ M de STP por 3h. Aumento de 100X.

Os dados sobre o desenvolvimento dos embriões clones reconstruídos com células em MCP positivas para a Anexina ou para a Caspase-9 são mostrados na Tabela 8. Foram realizadas três repetições, totalizando o uso de 262 oócitos para a micromanipulação e 69 para a partenogênese.

Não houve efeito do uso de células em MCP/Anexina ou MCP/Caspase-9 sobre as taxas de fusão aos oócitos enucleados quando comparadas com o grupo Controle ($p>0,05$), assim como entre elas ($p>0,05$).

Tabela 8 - Resultado do desenvolvimento embrionário de clones reconstruídos a partir de células em MCP tratadas por 3h com 10 μ M de STP e separadas por citometria de fluxo de acordo com a marcação para a Anexina V ou Caspase-9.

Grupos	No. Oócitos	No. Fundidos (%)	No. Clivados (%)	No. Blast. (%)
MCP/Anexina	90	68 (75,5)	40 (58,8) ^a	18 (26,4) ^a
MCP/Caspase-9	84	65 (77,3)	40 (61,5) ^a	8 (12,3) ^b
Controle	88	74 (84,0)	52 (70,2) ^a	17 (22,9) ^{a, b}
Partenogênese	69	-	62 (89,8) ^b	34 (49,2) ^c

^{a, b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (teste do χ^2 , $p<0,05$).

Também não foi observado efeito do uso de células positivas para a Anexina ou para a Caspase-9 como doadoras de núcleos sobre as taxas de clivagem dos embriões clonados ($p>0,05$).

No entanto, o uso de células em MCP positivas para a Caspase-9 reduziu o desenvolvimento dos embriões até o estágio de blastocisto em comparação ao grupo MCP/Anexina (12,3% vs 26,4%; $p<0,05$) e grupo Controle (12,3 vs 22,9%; $p<0,05$). Já o uso de células MCP/Anexina como doadoras de núcleo não afetou o desenvolvimento dos clones até o estágio de blastocisto ($p>0,05$).

6.4) Morfologia nuclear das células MCP/Anexina e MCP/Caspase-9 utilizadas na reconstrução embrionária e 24h após replaqueamento.

A morfologia nuclear do grupo de células utilizadas para a reconstrução dos embriões foi avaliada logo após a reconstrução dos embriões clonados (~1,5h após a separação das células) e 24h depois do replaqueamento em meio de cultivo sem a presença de STP. Os valores de fragmentação nuclear são mostrados na Figura 27.

Figura 27. Quantificação da fragmentação nuclear dos fibroblastos utilizados na TNS. A análise das células dos três grupos experimentais (Controle, MCP/Anexina e MCP/Caspase-9) foi realizada imediatamente após a reconstrução embrionária (Momento da TNS) e 24h depois do replaqueamento (24h depois). ^a, ^b, ^c, ^d Indicam diferença significativa entre os momentos de análise dentro do mesmo grupo de células (teste do X², $p < 0,05$). Valores entre parêntese representam o número amostral.

Observou-se que não houve diferença no percentual de células do grupo Controle com núcleos fragmentados no momento da TNS e 24h depois do replaqueamento (zero vs 3,8%, respectivamente; $p > 0,05$). Entretanto, houve diferença entre o percentual de células MCP/Anexina

com núcleo fragmentado no momento da TNS e 24h depois do replaqueamento (6,5 vs. 14,3%, respectivamente; $p < 0,05$) o mesmo ocorreu com a análise das células MCP/Caspase-9 (39,8 vs. 63,3%).

Na Figura 28 são mostradas algumas imagens da morfologia nuclear e da fragmentação nuclear (ponta de setas) observadas no momento da TNS e 24h depois do replaqueamento.

Figura 28. Imagens de fibroblastos remanescentes da gota de micromanipulação que foram avaliados com relação à fragmentação nuclear no momento da TNS (Momento da TNS) e 24h depois do replaqueamento em meio de cultivo sem a STP (24h depois). Os grupos Controle (A, A', B, B'), MCP/Anexina (C, C', D, D') e MACP/Caspase-9 (E, E', F, F') foram analisados no Momento da TNS e 24h depois conforme indicado. Para a análise da morfologia nuclear os fibroblastos foram corados com o Hoechst 33342 (10 μ g/mL) e fotografados em microscópio de fluorescência. As células fotografadas no momento da clonagem são as mesmas células replaqueadas, fotografadas 24h depois. As pontas de setas indicam núcleos considerados como fragmentados.

6.5) Análise da MCP nos Embriões Clones.

Com relação à contagem do número de células total e do índice de MCP nos embriões clones obtidos os resultados estão resumidos na Tabela 9.

Foi observada uma redução ($p < 0,05$) do número de células total dos embriões reconstruídos com células MCP/Anexina ($55,7\% \pm 20,6$) em comparação com o grupo Controle ($83,8 \pm 30,5$). Apesar de ter rendido menores taxas de desenvolvimento, o número de células dos embriões clones reconstruídos com células MCP/Caspase-9 ($67,2 \pm 23,8$) foi semelhante ($p > 0,05$) ao número de células dos embriões Controle.

Tabela 9 - Resultados da contagem do número de células total, percentual de núcleos em MCP e do índice de MCP de embriões clonados a partir de fibroblastos adultos tratados com $10 \mu\text{M}$ de STP por 3h e separados por citometria de fluxo de acordo com a marcação com a Anexina V (MCP/Anexina) ou a Caspase-9 (MCP/Caspase-9).¹

Células	Nº Embriões	Nº Total Células	Blastômeros TUNEL- positivos (%)	Índice de MCP
MCP/Anexina	8	$55,7 \pm 20,6^a$	$11,7 \pm 6,7$	$0,117 \pm 0,06$
MCP/Caspase-9	4	$67,2 \pm 23,8^b$	$10,4 \pm 4,1$	$0,105 \pm 0,04$
Controle	8	$83,8 \pm 30,5^b$	$12,4 \pm 5,6$	$0,124 \pm 0,05$

¹ Dados representam média $\pm$ DP. * Fibroblastos não tratados com a STP, não corados e passados pelo citômetro de fluxo. ^{a, b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (ANOVA).

Não houve efeito sobre o índice de MCP nos blastocistos clonados que foram reconstruídos a partir de células MCP/Anexina ou MCP/Caspase-9 ($p > 0,05$).

6.6) Análise da Expressão Gênica dos Embriões

Um total de 21 embriões foi analisado com relação à expressão dos genes OCT-4 e $\text{INF}\tau$, sendo 7 embriões FIV, 7 embriões clonados a partir de células Controle, 4 clonados a partir de células MCP/Anexina e 4 a partir de células MCP/Caspase-9.

Não houve diferença da expressão relativa dos transcritos dos genes OCT-4 e $\text{INF}\tau$ entre os embriões clonados a partir dos dois tipos de células em MCP e células Controle (Figura 29; $p>0,05$).

Entretanto, apesar da não significância dos resultados, pôde ser observada similaridade entre os embriões clonados a partir de células MCP/Anexina e os embriões FIV para o gene OCT-4. Assim como chama atenção o aumento da expressão do gene do $\text{INF}\tau$ dos embriões do grupo MCP/Anexina em relação aos embriões FIV.

Figura 29. Expressão relativa dos transcritos dos genes OCT-4 e $\text{INF}\tau$ em embriões clonados a partir de fibroblastos MCP/Anexina, MCP/Caspase-9 e células Controle em relação à expressão de embriões FIV ($p>0,05$).

7) Discussão

7.1) Experimento dose-resposta e curso temporal dos marcadores da MCP.

De acordo como já mencionado, a STP é um alcalóide potente inibidor da proteína kinase C, e possui um grande espectro de atividades celulares. Segundo Yoshida *et al.* (1997) e Chae *et al.* (2000), a STP é capaz de bloquear a progressão do ciclo celular quando utilizada em baixas concentrações e induzir rapidamente a MCP em uma grande variedade de linhas celulares incluindo fibroblastos quando utilizada em altas concentrações (0,1 - 10 μ M).

No experimento dose-resposta os fibroblastos foram tratados por 24h com diferentes concentrações de STP e foi observado que o aumento da concentração promoveu aumento da MCP nos fibroblastos bovinos, especialmente reduzindo a taxa de células Vivas e aumentando o taxa de células em MCP tardia/Necrose a partir da concentração de 10 μ M (70,8% e 1,5%, respectivamente), um indicativo de que o aumento da concentração de STP estimulou um maior número de células a entrarem em processo de morte.

Como o interesse neste experimento foi trabalhar com uma concentração de STP que garantisse taxas elevadas de MCP, a concentração de 10 μ M foi escolhida, por ter apresentado resultados semelhantes aos da concentração de 50 μ M.

Uma vez determinada a concentração de trabalho, foi investigado o curso temporal dos marcadores de MCP propostos e a análise da fragmentação nuclear ao longo do tempo de tratamento de modo a identificar um momento onde poderiam ser selecionadas células positivas

para cada um dos marcadores de MCP, porém antes do aumento da fragmentação nuclear.

A exposição da FS na “face” externa da membrana plasmática é considerada um evento inicial do processo de MCP, que ocorre previamente a fragmentação do DNA e permeabilização da membrana celular (SPAN *et al.*, 2002). A exposição da FS serve como um sinal de reconhecimento para a fagocitose por células vizinhas (macrófagos, por exemplo) promovendo a eliminação das células apoptóticas (BRUMATTI *et al.*, 2008).

Observou-se que com 3h após o início do tratamento com 10 μ M de STP a taxa de células em MCP (marcadas exclusivamente com a Anexina V) foi muito superior (89,8%) em comparação ao grupo controle (4,6%), sofrendo uma ligeira queda com 12h de tratamento (~ 65%) e reduzindo para 39,0% às 18h após o início do tratamento com a STP. Observou-se que a taxa de células em MCP tardia/Necrose foi aumentando ao longo do tempo até ultrapassar a taxa de células em MCP no tempo de 18h (57,7 vs. 39,0%). Como já esperado, a taxa de células Vivas sofreu uma redução drástica logo após 3h de tratamento e continuou reduzindo gradativamente até atingir um valor de 2,5% 18h após o tratamento com a STP. A taxa de Necrose se manteve muito baixa ao longo do tempo, indicando que a especificidade da indução pela STP.

Clodi *et al.* (2000) e Span *et al.* (2002) reportaram resultados semelhantes de análise do curso temporal da marcação da Anexina V de células induzidas a MCP. Estes autores confirmaram que a exposição da FS é um evento inicial do processo de morte e que se mantêm até estádios mais avançados.

Os resultados da análise da marcação pela Anexina V, está também de acordo com a observação morfológica das células durante o cultivo com a STP, uma vez que aparentemente quase todas as células sofreram uma mudança morfológica drástica após o tratamento com a STP.

Já com relação ao curso temporal da Caspase-9 ativada, observou-se que também houve um aumento do percentual de células positivas somente para a Caspase-9 ao longo do tempo, porém ao contrário do observado para a FS esse aumento foi gradativo, com 24,9% das células positivas no tempo de 3h, 30,6% no tempo de 12h e 36,7% no tempo de 18h após o tratamento com a STP.

A taxa de células em MCP tardia/necrose na análise do marcador Caspase-9, apresentou um aumento discreto 3h após o estímulo da STP (3,4%) e a partir daí aumentou gradativamente até atingir 39,4% das células com 18h após o tratamento com a STP. As células Vivas por sua vez apresentaram uma já esperada redução gradativa ao longo do tempo e as taxas de necrose foram sempre muito baixas indicando a especificidade da indução da MCP.

Estudos têm mostrado que a indução da MCP com a STP leva a exposição da FS com ativação da Caspase-9 em diversos tipos celulares especialmente em linhas de células neoplásicas (ANDERSSON *et al.*, 2000; FENG e KAPLOWITZ, 2002; MANNHERZ *et al.*, 2006; SAMRAJ *et al.*, 2007). O que está de acordo com os resultados obtidos no experimento.

Por outro lado, há estudos mostrando que em alguns tipos celulares, o mecanismo de indução da morte pela STP pode ocorrer de forma independente de Caspase-9 mediante um mecanismo denominado de AIF (*Apoptosis induction factor*) já bem estudado e descrito pela literatura (DÉAS *et al.*, 1998; SUSIN *et al.*, 1999; DUMONT *et al.*, 2000). Neste mecanismo podem ser observados a desidratação celular, condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, formação de *blebbings* e externalização da FS (DUMONT *et al.*, 2000).

Há ainda evidência de que os dois processos podem estar presentes ao mesmo tempo, uma vez que Andersson *et al.* (2000) observou que o pré-tratamento de células de retina com inibidores de caspase (inibindo inclusive a Caspase-9) reduziu o número de células com o DNA

fragmentado em 60% após o estímulo com a STP, porém ainda houve um grande percentual de fragmentação em comparação a células controle.

Neste experimento, 3h após tratamento com STP quase 90% das células estavam positivas para a Anexina V e quase 25% positivas para a Caspase-9. No entanto, não foi detectado sinal de fragmentação nuclear, avaliado pela coloração com o corante nuclear Hoechst 33342, e tampouco fragmentação de DNA (técnica de TUNEL). Neste tempo de tratamento, no entanto, já pôde ser observado claramente condensação da cromatina típica do processo de MCP (KROEMER *et al.*, 2009).

Às 6 e às 12h após o tratamento com a STP, a fragmentação nuclear pôde ser amplamente observada, principalmente com 12h (Figura 25), o que é concomitante com o tempo de aumento de células em MCP tardia para Anexina V e Caspase-9 (Figura 24). No entanto, foi observada uma diferença de quase 50% entre a quantidade de células com núcleo visivelmente fragmentado (~100% no tempo de 12h) e o percentual de células em MCP (27,6%) e MCP tardia/Necrose (21,6%) para a marcação com a Caspase-9 no tempo de 12h (Figura 24).

Além do mais, no tempo de 18h após o tratamento com a STP, o percentual de células consideradas como Vivas, no ensaio da Caspase-9, foi de 21,4% sendo que neste mesmo tempo de tratamento, 100% das células já apresentavam sinais de fragmentação nuclear visível pelo Hoechst (Figura 25).

Sendo assim, neste experimento, a observação conjunta da morfologia nuclear ao longo e o curso temporal dos marcadores de MCP estudados, especialmente a Caspase-9 ativa, pode levar a duas possibilidades: o ensaio da Caspase-9 ativa não foi sensível suficiente para detectar a enzima em pelo menos metade das células ou que o processo de MCP via AIF está presente e contribuindo para a ocorrência da fragmentação nuclear.

A observação de que houve aumento de 23% no percentual de células com o núcleo fragmentado após o replaqueamento das células MCP/Caspase-9 (Figura 27), também corrobora com essa última possibilidade, já que o *kit* de detecção utilizado se baseia no uso de um inibidor da Caspase-9 que fluoresce mediante a sua ligação covalente com a enzima e que, portanto a continuação do processo de morte não era esperada.

7.2) Produção dos embriões clonados com células tratadas com STP por 3h e separadas mediante o uso de dois marcadores do processo de MCP.

O uso de células MCP/Caspase-9 reduziu o desenvolvimento dos embriões até o estágio de blastocisto (12,3%) em comparação ao uso de células MCP/Anexina (26,4%; $p < 0,05$) e células Controle (22,9%; $p < 0,05$). Não havendo nenhum efeito do uso das células positivas para um dos dois marcadores de morte sobre as taxas de fusão e clivagem embrionária.

7.2.1) Embriões reconstruídos com células MCP/Anexina.

A reconstrução embrionária com células MCP/Anexina que foram tratadas com STP por 3h, não afetou o desenvolvimento dos embriões clones.

Levando-se em conta também a observação de que a fragmentação nuclear massiva dos fibroblastos ocorreu somente por volta das 6h de tratamento com a STP (Figura 25), pode-se inferir que o processo de morte das células MCP/Anexina foi revertido/interrompido em quase todas as células após a transferência para o interior do oócito enucleado.

Uma vez que o embrião clonado é resultado da “mistura” do citoplasma de duas células (oócito e célula somática) fica difícil isolar a importância de cada uma nesta descontinuidade do processo de morte.

Com o intuito de gerar algum conhecimento a respeito disso, a continuidade do processo de morte foi avaliado mediante o replaqueamento em cultivo de parte das células que foram utilizadas para a TNS. Observou-se que no momento da TNS o percentual de células MCP/Anexina com o núcleo fragmentado foi de 6,5% e que após 21h do replaqueamento na ausência da STP o valor de fragmentação nuclear subiu para 14,3% (Figura 27).

Em outras palavras, o tratamento com a STP por apenas 3h seguido de remoção do estímulo, evitou a fragmentação em aproximadamente 85,7% das células MCP/Anexina e em 92,2% das células MCP/Anexina que ainda não apresentavam fragmentação nuclear quando o estímulo foi removido. Esta reversão/interrupção do processo de morte ocorreu independentemente da TNS, talvez pelo fato de que no momento da remoção do estímulo da MCP o “ponto de não retorno” da maioria das células ainda não havia sido ultrapassado.

Portanto, considerando-se a percentual de reversibilidade do processo de morte que ocorreu mediante a TNS como 100% (já que o grupo MCP/Anexina não diferiu do Controle) e comparando-se com percentual de células revertidas mediante o replaqueamento (85,7%), incluindo as células com o núcleo fragmentado no momento da TNS, a diferença de 14,3% não permite avaliar a influência adicional do oócito no mecanismo de reversão do processo neste modelo, porém esta hipótese não pode ser descartada.

A fase exata do processo de morte na qual se encontravam os fibroblastos MCP/Anexina não foi determinada, porém de acordo com o estudo de Clodi *et al.* (2000) levando-se em conta a intensidade da marcação com a Anexina V, estas células estariam em uma fase posterior

ao “desbalanco” de proteínas pró- e anti-apoptóticas, porém anterior a fase de fragmentação do DNA, como mostrado neste estudo. Sendo assim, levando-se em consideração a importância da razão das proteínas pró- e anti-apoptóticas no desenvolvimento pré-implantação de embriões mamíferos, a introdução de fibroblastos em fases mais avançadas do processo de morte no interior de oócitos enucleados pode não ter afetado o mecanismo de MCP dos embriões.

A semelhança dos resultados de índice de MCP nos embriões obtidos (medido pela técnica de TUNEL) a partir de células MCP/Anexina em relação aos blastocistos Controle (células não tratadas com a STP) reforça esta possibilidade.

Além de não ter afetado a taxa de MCP nos blastocistos obtidos, o uso de células MCP/Anexina na TNS, não afetou ($p>0,05$) os níveis relativos de expressão dos genes OCT-4 e Interferon- τ (Figura 29).

A expressão do fator de transcrição POU5F1 (domínio POU, classe 5, fator de transcrição 1; conhecido como OCT4) é considerada como o marcador mais válido de para a reprogramação epigenética e pluripotência (WUENSCH *et al.*, 2007). Via de regra, a expressão deste gene em embriões clonados é sempre reduzida quando comparada com a expressão em embriões FIV (BOIANI *et al.*, 2002; BORTVIN *et al.*, 2003; SEBASTIANO *et al.*, 2005). Como também pôde ser observado neste experimento, apesar de não ter sido detectada diferença estatística significativa, provavelmente em função do número amostral.

O interferon- τ (INF- τ) é um interferon tipo I sintetizado e secretado pelo trofotoderma de blastocistos e está associado à sinalização embrionária inicial que é necessária para o reconhecimento da prenhez em espécies ruminantes (YAO *et al.*, 2009). Stojkovic *et al.* (1999) demonstraram que a quantidade de INF- τ secretada por embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* foi superior a dos embriões clonados. Arnold *et al.* (2006) não observaram diferença entre a abundância de RNAm do INF- τ entre embriões produzidos

in vivo, *in vitro* ou TNS. Neste experimento o nível de expressão relativo do RNAm do INF- τ não variou nos diferentes grupos analisados ($p>0,05$), porém pôde ser observado que houve uma tendência de aumento nos embriões clonados a partir de células MCP/Anexina.

As tendências de similaridade da expressão do OCT-4 entre embriões clonados com células MCP/Anexina e FIV e a tendência de superioridade observada com relação à expressão do gene do INF- τ (Figura 29), levam a especulação de que o núcleo da célula em MCP/Anexina pode ter sido melhor reprogramado epigeneticamente no processo de TNS. Há duas linhas de evidência que embasam esta possibilidade.

A primeira reside nas observações da ocorrência de modificações pós-traducionais de proteínas nucleares durante o processo de MCP. Segundo Martelli *et al.* (2001) durante o processo de morte ocorrem proteólise e redistribuições espaciais de proteínas importantes da matriz nuclear assim como modificações pós-traducionais (fosforilações, por exemplo) em várias histonas como a H3, H2B, H4 e H2AX. Ainda segundo estes autores, especula-se que tais alterações tem como função “abrir” espaços hipersensíveis à atividade das endonucleases de forma similar ao observado em regiões transcricionalmente ativas da cromatina.

Van Thuan *et al.* (2006) mostraram que a injeção de citoplasma de células somáticas em oócitos de camundongos antes de serem fecundados por injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI – *intracytoplasmatic sperm injection*) reduziu o desenvolvimento embrionário pré-implantação, reduziu o número de células total e a expressão do gene OCT-4 dos embriões. Uma vez que apenas a injeção de citoplasma somático causou esse efeito no desenvolvimento embrionário, os autores sugerem que o citoplasma da célula somática pode contribuir para a eficiência da técnica de TNS.

A possível melhora da reprogramação do núcleo da célula MCP/Anexina utilizada como doadora de núcleo pode ter sido em função

das modificações ultra-estruturais que ocorreram na cromatina da célula em MCP, porém antes da ocorrência de fragmentação nuclear, ou ainda que o efeito prejudicial à reprogramação nuclear na TNS que está presente no citoplasma de células somáticas, não esteja mais presente no citoplasma de células em processo de MCP. Ou ainda uma combinação dos dois fatores.

7.2.2) Embriões reconstruídos com células MCP/Caspase-9

A taxa de desenvolvimento de blastocisto obtida pelo uso de células MCP/Caspase-9 como doadoras de núcleo (12,3%) foi 53,7% inferior em relação à taxa de desenvolvimento do grupo reconstruído com células Controle (22,9%).

Considerando-se que a fragmentação nuclear massiva dos fibroblastos ocorreu já com 6h de tratamento com a STP (Figura 25), o processo de morte das células MCP/Caspase-9 foi revertido/interrompido em aproximadamente metade das células após a transferência para o interior do oócito enucleado.

Novamente com o intuito de gerar algum conhecimento a respeito da importância do oócito e da célula somática na reversibilidade do processo, células parte das células MCP/Casp-9 utilizadas na TNS foram recolocadas em cultivo. Observou-se que no momento da TNS o percentual de células MCP/Caspase-9 com núcleo fragmentado foi de 39,8% e que após 21h do replaqueamento em meio de cultivo sem a STP, o valor de fragmentação nuclear subiu para 63,3%.

Em outras palavras, o tratamento com a STP por apenas 3h seguido de remoção do estímulo, evitou a fragmentação nuclear em somente 36,7% das células MCP/Caspase-9 analisadas e em 76,5% das células

MCP/Caspase-9 que ainda não tinham o núcleo fragmentado no momento da remoção do estímulo da STP.

Considerando-se a percentual de reversibilidade do processo de morte que ocorreu mediante a TNS com células MCP/Caspase-9 como 53,7% (diferença na produção embrionária em relação ao Controle) e comparando-se com o percentual de células MCP/Caspase-9 revertidas mediante o replaqueamento em meio de cultivo sem a STP (36,7%), a diferença de 17% em favor da clonagem pode indicar que algum efeito adicional do oócito no mecanismo de reversão do processo de morte.

O *kit* utilizado neste experimento para a detecção da Caspase-9 se baseia na utilização de um inibidor da Caspase-9 ativa, que uma vez ligado covalentemente com a enzima emite sinal fluorescente. Portanto, de acordo com as próprias recomendações do fabricante o *kit* não é indicado para o posterior monitoramento da progressão do processo de morte. E este fato, pode ter favorecido o processo de reversão das células plaqueadas e mesmo das transferidos para o interior do citoplasma do oócito.

Sendo assim, parece que o ponto limitante para a redução na taxa de desenvolvimento embrionário foi a fragmentação nuclear presente nas células MCP/Caspase-9 no momento da reconstrução embrionária.

Os 50% de embriões que chegaram ao estágio de blastocisto não diferiam dos embriões controle com relação ao número de células total e nem quanto ao índice de MCP, indicando que foi possível a reprogramação de células em processo de MCP com a Caspase-9 ativa.

Fatehi *et al.* (2005) utilizaram espermatozóides com DNA fragmentado para a FIV e observaram apenas efeitos na taxa de produção de embriões e nenhum efeito nas taxas de clivagem. Tal fato parece ter ocorrido neste estudo uma vez que as taxas de clivagem não foram afetadas mesmo com 39,8% das células doadoras de núcleo apresentando fragmentação do DNA no momento da TNS.

Não houve efeito na expressão do gene OCT-4 dos embriões reconstruídos com células MCP/Caspase-9 que não diferiram dos embriões do grupo Controle sendo ambos inferiores aos embriões FIV como já esperado. Entretanto, o uso de células Caspase-9 positivas como doadoras de núcleo para a TNS, indicou uma tendência de redução profunda na expressão do gene INF- τ em relação aos embriões FIV e aos outros grupos de embriões clonados.

Um alto percentual de células MCP/Caspase-9 apresentaram o núcleo fragmentado e esta associação de eventos parece indicar uma "proximidade" entre as duas coisas, como descrito na literatura (GEWIES, 2003), de modo que talvez, as células que não possuíam núcleo fragmentado pela análise com o Hoechst, já apresentavam fragmentação de DNA em um grau imperceptível pela análise do núcleo como um todo.

Fatehi *et al.* (2006) também mostraram que o oócito foi capaz de reconstruir núcleos de espermatozóides com um grau menor de fragmentação causado por radiação. Portanto, pode ser que o oócito apesar de ter conseguido reparar núcleos com o DNA em fases iniciais de fragmentação tenha resultado em problemas no funcionamento adequado do mecanismo de expressão gênica embrionária.

8) Resumo dos resultados

1) A concentração de 10 μ M de STP por 24h foi eficiente em estimular um aumento do percentual de células em processo de MCP sem aumentar as taxas de morte por necrose.

2) Observou-se padrão de aumento seguido de redução, no curso-temporal da exposição da FS (Anexina V) com respectivo acúmulo de células em fases mais tardias de MCP (MCP tardia/Necrose), indicando complementação total do processo de morte.

3) Houve um aumento gradativo de células com a Caspase-9 ativa ao longo do tempo, assim como aumento do número de células em fases mais tardias da MCP (MCP tardia/Necrose).

4) Mediante a análise comparativa dos resultados do curso temporal da fragmentação do DNA e da Caspase-9 ativa, o processo de MCP desencadeado pela STP pode estar ocorrendo por outras vias como a do AIF que é caspase independente.

5) No tempo de 3h após o tratamento com 10 μ M de STP, não há ainda a ocorrência de fragmentação nuclear, porém há sinais de condensação da cromatina e alterações morfológicas nas células.

6) Houve redução no desenvolvimento embrionário quando células MCP/Caspase-9 foram utilizadas na TNS em comparação ao uso de células MCP/Anexina.

7) A taxa de fragmentação nuclear das células MCP/Anexina no momento da clonagem foi baixa e a maioria das células replaqueadas

(85,4%) apresentou potencial de interrupção/reversibilidade do processo de morte.

8) A taxa de fragmentação nuclear das células MCP/Caspase-9 foi no momento da clonagem foi elevada e somente 36,7% das células apresentaram potencial de interrupção/reversibilidade do processo de morte.

9) Não houve efeito do uso de células em MCP como doadoras de núcleo sobre o número de células total e o índice de MCP nos embriões reconstruídos.

10) Os embriões reconstruídos a partir de células MCP/Anexina V, foram aparentemente melhor reprogramados por apresentarem tendência ($p>0,05$) de aumento da expressão dos genes OCT-4 e INF- τ em comparação aos embriões reconstruídos com células Controle.

11) Embriões reconstruídos com células MCP/Caspase-9 tiveram tendência ($p>0,05$) de expressão reduzida do gene INF- τ comparado aos embriões clonados a partir de células controle.

9) Conclusões

Houve um efeito do uso de fibroblastos em diferentes fases do processo de MCP estimulado pela STP quando utilizados como doadores de núcleo para a clonagem.

O uso de células Células MCP/Anexina V para a TNS não afetou a taxa de blastocistos clonados.

O uso de fibroblastos com Caspase-9 ativa para a TNS afetou negativamente a taxa de blastocistos clonados, provavelmente pelo fato destas células estarem mais próximas do ponto de não retorno do processo de morte em comparação as células MCP/Anexina V.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO GERAL E MODELOS HIPOTÉTICOS.

Neste trabalho fibroblastos foram induzidos ou não a entrar em processo de MCP. Estas células foram utilizadas como doadoras de núcleo na técnica de TNS. Para tanto, o trabalho baseou-se na utilização da técnica de detecção da MCP em células vivas mediante ensaios fluorescentes com subsequente separação celular por citometria de fluxo e utilização das células na reconstrução dos clones.

No capítulo 2, foi inicialmente avaliado a possibilidade da utilização de fibroblastos em processo de MCP como doadores de núcleo na técnica de TNS e o posterior efeito sobre o desenvolvimento embrionário, estabelecimento de gestações e nascimento. Neste experimento, células em processo de MCP foram separadas por citometria de fluxo mediante a coloração com a Anexina V a partir de cultivos de fibroblastos que não foram tratados com nenhum indutor do processo de morte.

Os resultados obtidos foram de que aproximadamente 15% das células apresentaram a exposição da FS indicativa de processo de MCP. Fato que pode ser explicado pelo protocolo de restrição de SFB que foi utilizado para a sincronização do ciclo celular, previamente a análise da MCP.

A utilização das células em MCP como doadoras de núcleo na TNS resultou em redução do desenvolvimento até o estágio de blastocisto em comparação ao grupo reconstruído com células que não apresentaram marcação com a Anexina V (Vivas). Este último grupo, por sua vez, apresentou a melhor taxa de desenvolvimento embrionário do experimento sendo superior inclusive ao grupo de embriões reconstruídos com células Controle que não foram separadas com relação à marcação com a Anexina V. Além da menor taxa de desenvolvimento embrionário, os embriões reconstruídos a partir de células em MCP tiveram maior índice de MCP nos blastômeros.

A heterogeneidade das fases do processo nas células em processo de MCP que foram utilizadas pode explicar a redução observada no

desenvolvimento embrionário. Outra possibilidade, baseada nas observações a respeito do padrão da intensidade de marcação pela Anexina V em linfócitos (CLODI *et al.*, 2000), é de que a maioria das células em MCP utilizadas se encontravam em fase inicial da MCP quando ainda não “decidiram” sobre a continuidade ou não do processo de morte (fase de desbalanço das proteínas pró- e anti-apoptóticas). E que sua introdução no citoplasma de oócitos, afetou a maquinaria do processo de MCP embrionária, uma vez que o balanço destas proteínas é de fundamental importância durante esta fase do desenvolvimento (WARNER *et al.*, 1998; HARDY, 1999; BETTS e KING, 2001; JURISICOVA *et al.*, 1998; JURISICOVA e ACTON, 2004).

A capacidade de estabelecimento de prenhez e nascimento dos embriões clonados foi também avaliado neste experimento. Surpreendentemente, somente foram obtidos indivíduos vivos nos grupos de embriões clonados a partir de células Controle (dois indivíduos) e células em MCP (um indivíduo). Entre o 30º e 60º dias de gestação, observou-se uma perda gestacional total das prenhez obtidas a partir de embriões reconstruídos com células que não estavam em MCP.

Uma possível explicação para tal fato é que pode ter havido um processo de seleção no qual nas células em MCP que puderam ser reprogramadas, este processo se deu de forma mais eficaz. Logicamente, há outros fatores que podem ter influenciado nos resultados de gestação e nascimento, especialmente os fatores que estão fora do laboratório como protocolos de sincronização de receptoras, qualidade de corpo lúteo, manejo das vacas gestantes, por exemplo, que são difíceis de controlar.

Uma vez verificada a possibilidade da utilização da metodologia de marcação e separação de células em MCP por citometria de fluxo e considerando-se a possibilidade de que a heterogeneidade das fases do processo de morte ter influenciado nos resultados do experimento anterior, no capítulo 3, foi reavaliada a utilização dos fibroblastos em processo de

MCP como doadores de núcleos, porém desta vez foi utilizado uma agente indutor de morte, a STP de modo a sincronizar a ocorrência do processo.

Células em MCP de culturas tratadas com STP foram utilizadas como doadoras de núcleo de modo a avaliar o efeito do tempo de tratamento (progressão do processo de morte) sobre a capacidade de desenvolvimento dos embriões clonados. A STP se mostrou capaz de aumentar significativamente o percentual de células em MCP nas culturas tratadas. Porém ao longo do tempo, este estímulo teve um padrão de aumento seguido de redução das taxas de MCP e não houve acúmulo de células em fases mais tardias de morte, ao contrário do que era esperado. Observou-se também, que mesmo após 24h de tratamento não houve sinais de fragmentação nuclear típica do processo de morte.

Foi verificado um efeito do tempo de tratamento sobre a capacidade de desenvolvimento dos embriões clonados a partir das células MCP. Sendo que somente no tempo de 1h de tratamento com a STP o desenvolvimento dos embriões clonados a partir de células em MCP foi afetado negativamente.

Considerando em conjunto os resultados sobre o não acúmulo de células em estádios mais tardios de morte, a não ocorrência de fragmentação nuclear mesmo após um período prolongado de incubação com a STP e os resultados de desenvolvimento embrionário, especula-se que o estímulo causado pela STP neste experimento foi insuficiente para desencadear o processo de morte de maneira completa.

Deste modo, as células recém-estimuladas com a STP entraram em fase de decisão sobre a ocorrência ou não do processo de morte (fase de balanço dos genes pró- e anti-apoptóticos), porém com o estímulo insuficiente, permaneceram viáveis não ativando a fase de execução do processo. E assim como discutido nos resultados do capítulo 2, o efeito negativo sobre o desenvolvimento dos embriões clonados a partir de células recém-tratadas com a STP, pode ter ocorrido pela transferência para o

citoplasma do oócito de fatores citoplasmáticos (balanço de proteínas pró- e anti-apoptóticas alterado), que por sua vez afetaram a maquinaria de MCP do desenvolvimento embrionário.

No experimento do capítulo 4, portanto foi adquirida uma nova STP que foi diluída e armazenada a 4 °C de acordo como recomendado pelo fabricante. Neste capítulo, buscou-se verificar até que fase o processo de morte pode ser revertido utilizando-se o modelo de transferência nuclear. Neste sentido, foram utilizados dois marcadores de MCP em células vivas, a Anexina V e a Caspase-9 ativa.

A STP foi efetiva em aumentar significativamente o percentual de células em processo de morte. Complementarmente, ao contrário do observado no capítulo 3, observou-se acúmulo de células em fases mais tardias de morte tanto no curso temporal da marcação com a Anexina V quanto no da Caspase-9. Além da observação feita pelos resultados das citometrias, foi verificada fragmentação nuclear massiva após 6h de tratamento com a STP, indicando que o processo de morte foi estimulado por completo.

Um fato interessante foi que, comparando-se o percentual de células positivas para os marcadores de MCP com o percentual de fragmentação nuclear analisado pelo Hoechst 33342 às 12h após o tratamento com a STP, verificou-se que o percentual de células Caspase-9 positivas (52,2% no total sendo 30,6% Caspase-9 positivas e 21,6% Caspase-9/PI positivas; Figura 24) foi cerca de 50% menor que o percentual de células com fragmentação nuclear (~100%; Figura 25). No caso da marcação com a Anexina V no mesmo tempo de tratamento com a STP, o valor percentual de células Anexina positivas (93,5% no total, sendo 65,9% Anexina positivas e 27,6% Anexina/PI positivas) foi similar ao valor observado pela análise com o Hoechst 33342.

Há estudos mostrando que em alguns em outros tipos celulares, o mecanismo de indução da morte pela STP pode também ocorrer de forma

independente de Caspase-9 mediante um mecanismo denominado de AIF (*Apoptosis induction factor*) já bem estudado e descrito pela literatura, que, por exemplo, provoca a externalização da FS na membrana das células (DEAS *et al.*, 1998; SUSIN *et al.*, 1999; DUMONT *et al.*, 2000).

Isso indica que, talvez parte do processo de morte observado neste experimento esteja ocorrendo de forma independente da Caspase-9, via o AIF, por exemplo.

Para as transferências nucleares neste experimento decidiu-se utilizar fibroblastos positivos para cada um dos marcadores de MCP, antes da ocorrência da fragmentação do DNA. Observou-se que 3h após o tratamento com a STP, os núcleos dos fibroblastos tratados apesar de visivelmente condensados, não tinham sinais de fragmentação nuclear (análise com o Hoechst 33342) e de DNA (análise de TUNEL). Portanto, as células MCP/Anexina e MCP/Caspase-9 utilizadas para as clonagens foram separadas por citometria de culturas tratadas com a STP por 3h.

O uso de células MCP/Anexina como doadoras de núcleo para a TNS, não afetou o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, enquanto que o uso de células MCP/Caspase-9 reduziu o desenvolvimento até blastocisto.

Considerando-se a elevada capacidade de reversibilidade das células MCP/Anexina replaqueadas sugere-se o resultado de desenvolvimento após a TNS não tenha sido afetado pelo fato de que as próprias células possuem mecanismos de reversão/interrupção do processo de morte.

Já para as células MCP/Caspase-9, o percentual de células com o núcleo fragmentado no momento da TNS pode estar relacionado com a redução do desenvolvimento.

Não houve diferença entre os dois grupos com relação ao índice de MCP presente nos blastocistos obtidos, porém os embriões produzidos a partir

de células MCP/Anexina apresentaram maior nível de expressão do gene OCT-4 em relação aos outros grupos de embriões clonados, sendo semelhante ao grupo FIV ($p > 0,05$).

Não houve diferença entre os grupos com relação ao nível de expressão do gene INF- τ . Há indícios de que modificações pós-traducionais de proteínas nucleares ocorre durante o processo de MCP. Segundo Martelli *et al.* (2001) tais alterações tem como função “abrir” espaços hipersensíveis a atividade das endonucleases de forma similar ao observado em regiões transcricionalmente ativas da cromatina. Por outro lado, Van Thuan *et al.* (2006) sugerem que o citoplasma da célula somática pode afetar a eficiência da técnica de TNS.

Modificações ultra-estruturais que ocorreram na cromatina da célula em MCP, antes da ocorrência de fragmentação nuclear, ou a remoção do “efeito” prejudicial à reprogramação nuclear na TNS presente no citoplasma de células somáticas podem explicar a melhora da reprogramação do núcleo da célula MCP/Anexina. Ou uma combinação dos dois fatores.

Já para os embriões reconstruídos com as células em MCP/Caspase-9, a proximidade com a ocorrência da fragmentação nuclear observada mediante a observação do elevado índice de fragmentação nuclear nas células utilizadas para a TNS, especula-se que os embriões resultantes tenham sido reconstruídos a partir de células cujo núcleo apesar de não estar fragmentado, já possuía modificações ultra-estruturais mais avançadas de modo que houve um efeito prejudicial à reprogramação dos genes analisados.

De acordo com os resultados obtidos ao longo dos experimentos, dois modelos hipotéticos são propostos sobre a utilização de células em processo de morte como doadoras de núcleo para a TNS. O primeiro (Figura 30) contempla a utilização de células com o estímulo incompleto de morte (Capítulos 2 e 3) e o segundo (Figura 31) células com estímulo completo de morte (Capítulo 4).

Figura 30. Modelo hipotético gráfico do que ocorre quando células com estímulos incompletos de MCP são utilizadas como doadoras de núcleo para a TNS, o que se aplica as células dos Capítulos 2 e 3. (A) Ilustração da célula somática com estímulo insuficiente de morte antes da fusão com o oócito, podendo ser observado que apesar de balanço das proteínas pró- e antiapoptóticas estar ligeiramente alterado (A-1), não há liberação do citocromo c (A-2) fazendo com que a célula não complete o processo de MCP. (B) Ilustração do momento da fusão da célula somática ao oócito enucleado. Durante a fusão, o ligeiro desbalanço das proteínas pró- e anti-apoptóticas presentes nas células (B-1 e B-2) interage com o balanço destas proteínas presentes no interior do citoplasma do oócito enucleado (B-3) promovendo um desbalanço acentuado no oócito (B-4) de modo a interferir no mecanismo de MCP do oócito/embrião (B-5).

Figura 31. Modelo hipotético gráfico do que ocorre quando células com estímulo completo de MCP são utilizadas como doadoras de núcleo para a TNS. O que se aplica às células do Capítulo 4. **(A)** Ilustração da célula somática com estímulo completo de morte antes da fusão com o oócito. Mediante o estímulo da STP, ocorre um desbalanço das proteínas pró- e anti-apoptóticas (A-1), seguido pela liberação do citocromo c (A-2), formação do apoptossomo que contém a Caspase-9 ativa (A-4), que por sua vez ativa a Caspase-3 (A-5) que causa a fragmentação do DNA (A-6). Há a possibilidade de que o desbalanço das proteínas pró- e anti-apoptóticas pode também liberar o AIF da mitocôndria (A-7) que pode levar a fragmentação do DNA independentemente de caspases. **(B)** Ilustração do momento da fusão da célula somática MCP/Anexina utilizada no Capítulo 4. Provavelmente a célula já tinha ultrapassado a fase de desbalanço (B-1) e já teria liberado o citocromo c (B-2) ou mesmo o AIF (B-3), porém não tinha entrado na fase de execução. A introdução desta célula no citoplasma do oócito enucleado não afetou o desbalanço das proteínas (B-4) e então o processo foi revertido por fatores desconhecidos, talvez IAPs de origem oocitária ou mesmo oriundas da somática (B-6). **(C)** Ilustração do momento da fusão da célula somática MCP/Caspase-9 utilizada no Capítulo 4. Uma vez que estas células foram positivas para a Caspase-9 ativa, já havia ocorrido a fase de desbalanço das proteínas pró- e anti-apoptóticas (C-1), permeabilização mitocondrial (C-2), liberação do citocromo c (C-3) e ativação da Caspase-9 (C-4). Uma vez inserida no interior do citoplasma do oócito enucleado, a Caspase-9 não levou a ativação da Caspase-3 (C-5) em função da própria natureza do kit utilizado que se baseava na utilização de um inibidor de Caspase-9, se presente o AIF foi inibido algum mecanismo desconhecido (C-6) e o mecanismo de balanço das proteínas oocitárias não foi alterado (C-7) uma vez que as células já se encontravam em uma fase mais avançada do processo.

10) Referências Bibliográficas

ALESSI, F.; QUARTA, S.; SAVIO, M.; RIVA, F.; ROSSI, L.; STIVALA, L.; SCOVASSI, I.; MEIJER, L.; PROSPERI, E. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Olomoucine and Roscovitine Arrest Human Fibroblasts in G1 Phase by Specific Inhibition of CDK2 Kinase Activity. *Experimental Cell Research* v. 245, p 8–18, 1998.

ANDERSSON, M.; SJÖSTRAND, J.; PETERSEN, A.; HONARVAR, A. K.; KARLSSON, J. O. Caspase and proteasome activity during staurosporin-induced apoptosis in lens epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 41 (9), p.2623-32, 2000.

ARNOLD, D. R.; BORDIGNON, V.; LEFEBVRE, R.; MURPHY, B. D.; SMITH, L. C. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. *Reproduction*, v. 132(2), p. 279-90, 2006.

AYRES, M.; AYRES, JR. M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. Bioestat 4.0 Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. *Sociedade Civil Mamirauá*, 2005.

BETTS, D. H.; BORDIGNON, V.; HILL, J. R.; WINGER, Q.; WESTHUSIN, M. E.; SMITH, L. C.; KING, W. A. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.98, n.3, p.1077-1082, 2001.

BETTS, D. H.; KING, W. A. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*, v. 55(1), p.171-91, 2001.

BLECK, G. T.; WHITE, B. R.; MILLER, D. J.; WHEELER, M. B. Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. *J. Anim. Sci.*, v. 76, p. 3072-3078, 1998.

BLELLOCH, R.; WANG, Z.; MEISSNER, A.; POLLARD, S.; SMITH, A.; JAENISCH, R. Reprogramming Efficiency Following Somatic Cell Nuclear Transfer Is Influenced by the Differentiation and Methylation State of the Donor Nucleus. *Stem Cells*, v. 24, p. 2007–2013, 2006.

BOIANI, M.; ECKARDT, S.; SCHOLER, H. R.; MACLAUGHLIN, K. J.; Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev*, v.16, p. 1209–1219, 2002.

BORDIGNON, V.;, CLARKE, H. J. ; SMITH, L. C. Factors controlling the loss of immunoreactive somatic histone H1 from blastomere nuclei in oocyte cytoplasm: a potential marker of nuclear reprogramming. *Dev. Biol.* May 233, p. 192-203, 2001.

BAGUISI, A.; BEHDOODI, E.; MELICAN, D.T.; POLLOCK, J.S.; DESTREMPES, M.M.; CAMMUSO, C.; WILLIAMS, J.L.; NIMS, S.D.; PORTER, C.A.; MIDURA, P.; PALACIOS, M.J.; AYRES, S.L.; DENNISTON, R.S.; HAYES, M.L.; ZIOMEK, C.A.; MEADE, H.M.; GODKE, R.A.; GAVIN, W.G.; OVERSTRÖM, E.W.; ECHELARD, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.*, v.17, p.456-461, 1999.

BEHYAN, Z.; FORSBERG, E. J.; ELIERTSEN, K. J.; KENT-FIRST, M.; FIRST, N. L. Gene Expression in Bovine Nuclear Transfer Embryos in Relation to Donor Cell Efficiency in Producing Live Offspring. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 74, p. 18–27, 2007.

BORTVIN, A.; EGGAN, K.; SKALETSKY, H.; AKUTSU, H.; BERRY, D. L.; YANAGIMACHI, R.; PAGE, D. C.; JAENISCH, R.; Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development*. v. 130(8), p. 1673-80, 2003.

BOSCO, L.; RUVOLO, G.; MORICI, G.; MANNO, M.; CITTADINI, E.; ROCCHERI, M. C. Apoptosis in human unfertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, v. 84(5), p. 1417-23, 2005.

BOSSY-WETZEL, E.; NEWMAYER, D. D.; GREEN, D. R. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.*, v. 17(1), p.37-49, 1998.

BOURC'HIS, D.; LE BOURHIS, D.; PATIN, D.; NIVELEAU, A.; COMIZZOLI, P.; RENARD, J. P.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr. Biol.*, v.11, p. 1542–1546, 2001.

BRISON, D. R.; SCHULTZ, R. M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod.* v. 56, p. 1088-96, 1997.

BROPHY, B.; SMOLENSKI, G.; WHEELER, T.; WELLS, D.; L'HUILLIER, P.; LAIBLE, G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat. Biotechnol.*, v. 21, p. 157-162, 2003.

BRUMATTI, G.; SHERIDAN, C.; MARTIN, S. J. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods*, v. 44, p. 235–240, 2008.

BYRNE, J. A.; PEDERSEN, D. A.; CLEPPER, L. L.; NELSON, M.; SANGER, W. G.; GOKHALE, S.; WOLF, D. P.; MITALIPOV, S. M. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*, v. 450, p. 497-505, 2007.

CAMPBELL, K.H.S.; LOI, P.; OTAEGUI, P.J.; WILMUT, I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev. Reprod.*, v.1, p.40-46, 1996a.

CAMPBELL, K. H. S.; McWHIR, J.; RITCHIE, W. A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, v.380, p.64-66, 1996b.

CAMPBELL, K.; ALBERIO, R.; CHOI, I.; FISHER, P.; KELLY, R.; LEE, J. H.; MAALOUF, W. Cloning: eight years after Dolly. *Reprod. Domest. Anim.*, v.40, p. 256-268, 2005.

CEZAR, G. G.; BARTOLOMEI, M. S.; FORSBERG, E. J.; FIRST, N. L.; BISHOP, M. D.; ELIERTSEN, K. J. Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.*, v.68, p. 1009–1014, 2003.

CHANG, H. K.; LIM, J. M.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; MOON, S. Y.; HWANG, W. S. Blastocyst formation, karyotype, and mitochondrial DNA of interspecies embryos derived from nuclear transfer of human cord fibroblasts into enucleated bovine oocytes. *Fertility and Sterility*, v. 80, n. 6, p. 1380-1387, 2003.

CHO, S. R.; OCK, S. A.; YOO, J. G.; KUMAR, B. M.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Effects of Confluent, Roscovitine Treatment and Serum Starvation on the Cell-cycle Synchronization of Bovine Foetal Fibroblasts. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 40, p. 171-176, 2005.

CIBELLI, J. B.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; KANE, J. J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; LEÓN, F. A. P.; ROBL, J. M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, v. 280, p. 1256-1258, 1998.

CIBELLI, J. B.; CAMPBELL, K. H.; SEIDEL, G. E. WEST, M. D.; LANZA, R. P. The health profile of cloned animals. *Nat. Biotechnol.*, v. 20, p. 13-14, 2002.

CHAE, H. J.; KANG, J. S.; BYUN, J. O.; HAN, K. S.; KIM, D. U.; OH, S. M.; KIM, H. M.; CHAE, S. W.; KIM, H. R. Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol. Res.*, v. 42, p. 373-81, 2000.

CHESNE, P.; ADENOT, P.G.; VIGLIETTA, C.; BARATTE, M.; BOULANGER, L.; RENARD, J.P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.*, v.20, p.366-369, 2002.

CLODI, K.; Kliche, K. O.; ZHAO, S.; WEIDNER, D.; SCHENK, T.; CONSOLI, U.; JIANG, S.; SNELL, V.; ANDREEFF, M. Cell-surface exposure of phosphatidylserine correlates with the stage of fludarabine-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and expression of apoptosis-regulating genes. *Cytometry* v. 40, p. 19-25, 2000.

DAI, Y.; VAUGHT, T. D.; BOONE, J.; CHEN, S. H.; PHELPS, C. J.; BALL, S.; MONAHAN, J. A.; JOBST, P. M.; McCREATH, K. J.; LAMBORN, A. E.; COWELLUCERO, J. L.; WELLS, K. D.; COLMAN, A.; POLEJAEVA, I. A.; AYARES, D. L. Targeted disruption of the alpha1,3- galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.*, v.20, p. 251-255, 2002.

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 98, p. 13734–13738, 2001.

DEAN, W.; SANTOS, F.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v. 14, p. 93-100, 2003.

DÉAS, O.; DUMONT, C.; MACFARLANE, M.; ROULEAU, M.; HEBIB, C.; HARPER, F.; HIRSCH, F.; CHARPENTIER, B.; COHEN, G. M.; SENIK, A. Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J. Immunol.*, v. 161(7), p. 3375-83, 1998.

DENNING, C.; BURL, S.; AINSLIE, A.; BRACKEN, J.; DINNYES, A.; FLETCHER, J.; KING, T.; RITCHIE, M.; RITCHIE, W. A.; ROLLO, M.; De SOUSA, P.; TRAVERS, A.; WILMUT, I.; CLARK, A.J. Deletion of the alpha(1,3) galactosyltransferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat. Biotechnol.*, v.19, p. 559-562, 2001.

DOMINKO, T.; MITALIPOVA, M.; HALEY, B.; BEYHAN, Z.; MEMILLI, E.; MC KUSICK, B.; FIRST, N. L. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.* v. 60, p.1496-1502, 1999.

DUMONT, C.; DÜRRBACH, A.; BIDÈRE, N.; ROULEAU, M.; KROEMER, G.; BERNARD, G.; HIRSCH, F.; CHARPENTIER, B.; SUSIN, S. A.; SENIK, A. Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood T lymphocytes: reversibility at low apoptotic insult. *Blood*, v. 1;96, p. 1030-8, 2000.

EDWARDS, J. L.; DORADO, C. M.; WILSON, T. J.; SCHRICK, F. N. Development of cloned embryos reconstructed with serum fed or serum starved adult granulosa cells. *Theriogenology*, v. 55, p. 265, 2001.

ENRIGHT, B. P.; TANEJA, M.; SCHREIBER, D.; RIESEN, J.; TIAN, X. C.; FORTUNE, J. E.; YANG, X. Reproductive characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. *Biol. Reprod.*, v. 66, p. 291-296, 2002.

ENRIGHT, B. P.; KUBOTA, C.; YANG, X.; TIAN, X. C. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.*, v.69, p. 896–901, 2003.

ENRIGHT, B. P.; SUNG, L. Y.; CHANG, C. C.; YANG, X.; TIAN, X. C. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.*, v. 72, p. 944-948, 2005.

FAHRUDIN, M.; OTOI, T. ; KARJA, N. W. ; MORI, M.; MURAKAMI, M. ; SUZUKI, T. Analysis of DNA fragmentation in bovine somatic nuclear transfer embryos using TUNEL. *Reproduction*. v. 124, p. 813-9, 2002.

FATEHI, A. N.; BEVERS, M. M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B. A.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J. Androl.*, v. 27(2), p. 176-88, 2006.

FENG, G.; KAPLOWITZ, N. Mechanism of staurosporine-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v. 282(5), p. 825-34, 2002.

FERREIRA, C. R.; MEIRELLES, F. V.; YAMAZAKI, W.; CHIARATTI, M. R.; MEO, S. C.; PERECIN, F.; SMITH, L. C.; GARCIA, J. M. The kinetics of donor cell mtDNA in embryonic and somatic donor cell-derived bovine embryos. *Cloning and Stem Cells*, v. 9, p. 618-629, 2007.

GALLI, C.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Introduction to Cloning by Nuclear Transplantation. *Cloning Stem Cells*, v.5, p.223-232, 2002.

GALLI, C.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; COLLEONI, S.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, v.424, p. 635, 2003.

GEWIES, A. Introduction to Apoptosis. In: *Apo Review*, 2003.

GIBBONS, J.; ARAT, S.; RZUCIDLO, J.; MIYOSHI, K.; WALTEBURG, R.; RESPESS, D.; VENABLE, A.; STICE, S. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol. Reprod.*, v.66, p. 895-900, 2002.

GIRALDO, A. M.; LYNN, R. A. ; PURPERA J. W.; GODKE, M. N.; BONDIOLI, K. R. DNA Methylation and Histone Acetylation Patterns in Cultured Bovine Fibroblasts for Nuclear Transfer. *Mol. Reprod. Dev.*, 74, p. 1514–1524, 2007.

GJØRRET JO, KNIJN HM, DIELEMAN SJ, AVERY B, LARSSON LI, MADDOX-HYTTEL P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol Reprod.* v. 69, p. 1193-200, 2003.

GREEN, A. L.; WELLS, D. N.; OBACK, B. Cattle Cloned from Increasingly Differentiated Muscle Cells. *Biol. Reprod.* v. 77, p. 395–406, 2007.

HAN, Y. M.; KANG, Y. K.; KOO, D. B.; LEE, K. K. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. *Theriogenology*, v.59, p. 33-44, 2003.

HAYES, O.; RAMOS, B.; RODRÍGUEZ, L. L.; AGUILAR, A.; BADÍA, T.; CASTRO, F. O. Cell confluency is as efficient as serum starvation for induced arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in granulosa and fibroblast cells of cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.87, p. 181-192, 2005.

HAO, Y.; LAI, L.; MAO, J; IM, G. S. ; BONK, A.; PRATHER, R. S. Apoptosis and in vitro development of preimplantation porcine embryos derived in vitro or by nuclear transfer. *Biol Reprod.* v. 69, p. 501-7, 2003.

HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. *Rev. Reprod.*, v. 4(3), p.125-34, 1999.

HEISKANEN, K. M.; BHAT, M. B.; WANG, H. W.; MA, J.; NIEMINEN, A. L. Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J. Biol. Chem.*, v. 274(9), p.5654-8, 1999.

HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, v. 45, n. 3, p. 353-361, 2005.

HIENDLEDER, S.; ZAKHARTCHENKO, V.; WENIGERKIND, H.; REICHENBACH, H. D.; BRUGGERHOFF, K.; PRELLE, K.; BREM, G.; STOJKOVIC, M.; WOLF. E.

Heteroplasmy in bovine fetuses produced by intra- and inter-subspecific somatic cell nuclear transfer: neutral segregation of nuclear donor mitochondrial DNA in various tissues and evidence for recipient cow mitochondria in fetal blood. *Biol. Reprod.*, v. 68, n. 1, p. 159–166, 2003.

HIENDLEDER, S.; ZAKHARTCHENKO, V. ; WOLF, E. Mitochondria and the success of somatic cell nuclear transfer cloning: from nuclear-mitochondrial interactions to mitochondrial complementation and mitochondrial DNA recombination. *Reprod Fertil Dev.* v. 17, p. 69-83, 2005.

HILL, J. R. Abnormal in utero development of cloned animals: Implications for human cloning. *Differentiation*, v. 69, p. 174–178, 2002.

HOCHEDLINGER, K; JAENISCH, R. On the cloning of animals from terminally differentiated cells. *Nature Genetics*, v. 39, p. 136 – 137, 2007.

HUMPHERYS, D.; EGGAN, K.; AKUTSU, H.; HOCHEDLINGER, K.; RIDEOUT III, W. M.; BINISZKIWICZ, D.; YANAGIMACHI, R.; JAENISCH, R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, v. 293, p. 95-97, 2001.

HUMPHREYS, D.; EGGAN, K.; AKUTSU, H.; FRIEDMAN, A.; HOCHEDLINGER, K.; YANAGIMACHI, R.; LANDER, E. S.; GOLUB, T. R.; JAENISCH, R. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 99, p. 12889–12894, 2002.

JANG, G.; PARK, E. S; CHO, J. K.; BHUIYAN, M. M.; LEE, B. C.; KANG, S. K.; HWANG, W. S. Preimplantational embryo development and incidence of blastomere apoptosis in bovine somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed with long-term cultured donor cells. *Theriogenology*, v. 62, p. 512-21, 2004.

JOUNEAU, A.; RENARD, J. P. Reprogramming in nuclear transfer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 13, p. 486-491, 2003.

JU, J. Y.; PARK, C. Y.; GUPTA, M. K.; UHM, S. J.; PAK, E. C.; RYOO, Z. Y.; CHO, Y. H.; CHUNG, K. S.; LEE, H. T. Establishment of stem cell lines from nuclear transferred and parthenogenetically activated mouse oocytes for therapeutic cloning. *Fertility and Sterility*, 2007.

JURISICOVA, A.; ACTON, B. M. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction*, v. 128, p. 281–291, 2004.

JURISICOVA, A.; LATHAM, K. E.; CASPER, R. F.; VARMUZA, S. L. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 51, p. 243–253, 1998.

KANG, Y. K.; KOO, D. B.; PARK, J. S.; CHOI, Y. H.; CHUNG, A. S.; LEE, K. K.; HAN, Y. M. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet.*, v. 28, p. 173–177, 2001.

KANKA, J.; SMITH, S. D.; SOLOY, E.; HOLM, P.; CALLESEN, H. Nucleolar ultrastructure in bovine nuclear transfer embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 52, n. 3, p. 253–263, 1999.

KATO, Y.; TANI, T.; SOTOMARU, Y.; KUROKAWA, K.; KATO, J-Y.; DOGUCHI, H.; YASUE, H.; TSUNODA, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, v.282, p. 2095–2098, 1998.

KATO, Y.; YABUUCHI, A.; MOTOSUGI, N.; KATO, J.; TSUNODA Y. Developmental potential of mouse follicular epithelial cells and cumulus cells after nuclear transfer. *Biol Reprod.*, v. 61(4), p. 1110–4, 1999.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, v. 26, p.18, 1972.

KERR, J History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, v. 181, p. 471– 474, 2002.

KIM, M. K.; JANG, G.; OH, H. J.; YUDA, F.; KIM, H. J.; HWANG, W. S.; HOSSEIN, M. S.; KIM, J. J.; SHIN, N. S.; KANG, S. K.; LEE, B. C. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning and Stem Cells.*, v. 9, p.130–137, 2007.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, v. 16(1), p. 3-11, 2009.

KOO, D. B.; KANG, Y. K.; CHOI, Y. H.; PARK, J. S.; KIM, H. N.; OH, K. B.; SON, D. S.; PARK, H. P.; LEE, K. K.; HAN, Y. M. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cell in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol. Reprod.*, v. 67, p. 487-492, 2002.

KUBIAK, J. Z.; PRATHER, R. S.; MAUL, G. G.; SCHATTEN, G. Cytoplasmic modification of the nuclear lamina during pronuclear-like transformation of mouse blastomere nuclei. *Mech. Dev.*, v. 35, p. 103-111, 1991.

KUBOTA, C.; YAMAKUCHI, H.; TODOROKI, J.; MIZOSHITA, K.; TABAR, N.; BARBER, M.; YANG, X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 97, p. 990-995, 2000.

KUES, W. A.; ANGER, M.; CARNWARTH, J. W.; MOTLIK, J.; NIEMAN, H. Cell cycle synchronization of porcine fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol. Reprod.*, v. 62, p. 412-419, 2000.

KANG, J. X.; WANG, J.; WITT, W. T.; YONG, H. Y.; HAO, Y.; WAX, D. M.; MURPHY, C. N.; RIEKE, A.; SAMUEL, M.; LINVILLE, M. L.; KORTE, S. W.; EVANS, R. W.; STARZL, T. E.; PRATHER, R. S.; DAI, T. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nature Biotech.*, v. 24, p. 435-436, 2006.

LANZA, R. P.; CIBELLI, J. B.; BLACKWELL, C.; CRISTOFALO, V. J.; FRANCIS, K.; BAERLOCHER, G. M.; MAK, J.; SCHERTZER, M.; CHAVEZ, E. A.; SAWYER, N.; LANSDORP, P. M.; WEST, M. D. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*, v. 288, p. 665-669, 2000.

LAWRENCE, J. L.; SCHRICK, F. N.; HOPKINS, F. M.; WELBORN, M. G.; MC CRACKEN, M. D.; SONSTEGARD, T.; WILSON, T. J.; EDWARDS, J. L. Fetal losses

and pathologic findings of clones derived from serum-starved versus serum-fed bovine ovarian granulosa cells. *Reprod. Biol.*, v. 5, p. 171-84, 2005.

LEE, B. C.; KIM, M. K.; JANG, G.; OH, H. J.; YUDA, F.; KIM, H. J.; HOSSEIN, M. S.; KIM, J. J.; KANG, S. K.; SCHATTEN, G.; HWANG, W. S. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, v. 436, p. 641, 2005.

LIU, L.; KEEFE, D. L. Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. *Biol. Reprod.*, v. 62, p. 1828-34, 2000.

LIU, S. Z.; YAO, L. J.; JIANG, M. X.; LEI, Z. L.; ZHANG, L. S.; ZHANG, Y. L.; SUN, Q. Y.; ZHENG, Y. L.; SONG, X. F.; CHEN, D. Y. Apoptosis in rabbit embryos produced by fertilization or nuclear transfer with fibroblasts and cumulus cells. *Reproduction*, v. 130, p. 359-66, 2005.

LOI, P.; CLINTON, M.; BARBONI, B.; FULKA, J.; CAPPAL, P.; FEIL, R.; MOOR, R. M.; PTAK, G. Nuclei of Nonviable Ovine Somatic Cells Develop into Lambs after Nuclear Transplantation. *Biol. Reprod.*, v. 67, p. 126-132, 2002.

MANNHERZ, H. G.; GONSIOR, S. M.; WU, X.; POLZAR, B.; POPE, B. J.; WARTOSCH, L.; WEEDS, A. G. Dual effects of staurosporine on A431 and NRK cells: microfilament disassembly and uncoordinated lamellipodial activity followed by cell death. *Eur. J. Cell. Biol.*, v. 85(8), p. 785-802, 2006, 2006.

MARTELLI, A. M.; ZWEYER, M.; OCHS, R. L.; TAZZARI, P. L.; TABELLINI, G.; NARDUCCI, P.; BORTUL, R. Nuclear apoptotic changes: an overview. *J. Cell Biochem.*, v. 82(4), p. 634-46, 2001.

MARTIN, S. J.; GREEN, D. R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, v. 82(3), p.349-52, 1995.

MARTIN, S. J.; REUTELINGSPERGER, C. P. M.; MC GAHON, A. J.; RADER, J. A.; ROB, C. A. A.; LA FACE, D. M.; GREEN, D. R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of

the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.*, v. 182, p. 1545–1556, 1995.

MATWEE, C.; BETTS, D. H; KING, W. A. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, v. 8(1), p. 57-68, 2000.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development *in vitro*. *Science*, v. 226, p. 1317-1319, 1984.

MEIRELLES, F. V.; BORDIGNON, V.; WATANABE, Y.; WATANABE, M.; DAYAN, A.; LOBO, R. B.; GARCIA, J. M.; SMITH, L. C. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. *Genetics*, v. 158, p. 351-356, 2001.

MEIRELLES, F. V.; PROVIDELO, F. D.; MERIGHE, G. K. F.; MIRANDA, M.; TRALDI, A.; BIRGEL, E.; VALIM, J. R.; WATANABE, Y. F. Desafios para TN comercial – planejando o futuro. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34 (Supl 1), p. 235-242, 2006.

MERIGHE, G. K. F. Passagem celular, sexo e transcrição X-específica interferem no desenvolvimento embrionário e fetal de bovinos produzidos por transferência nuclear. 2007. 131f. Tese (Doutorado em Qualidade e Produtividade Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

MIGNOTTE, B.; VAYSSIERE, J. L. Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.*, v. 252, p. 1-15, 1998.

MOREIRA, P. N.; ROBL, J. M.; COLLAS, P. Architectural defects in pronuclei of mouse nuclear transplant embryos. *J. Cell Sci.*, v. 116, p. 3713-3720, 2003.

MORGAN, H. D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics*, v. 14, p. 47-58, 2005.

MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev. Biol.*, v. 213, p. 1-17, 1999.

NEL-THEMAAT, L.; GOMEZ, M. C.; POPE, C. E.; LOPEZ, M.; WIRTU, G.; JENKINS, G. A.; COLE, A.; DRESSER, B. L.; BONDIOLI, K. R.; GODKE, R. A. Cloned Embryos from Semen. Part 2: Intergeneric Nuclear Transfer of Semen-Derived Eland (*Taurotragus oryx*). Epithelial Cells into Bovine Oocytes. *Cloning and Stem Cells*, v. 10, p. 161-172, 2008.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.*, v. 24, p. 372–376, 2000.

OBACK, B.; WELLS, D. The methods in madness. In: *Somatic Cell Nuclear Transfer*, 2007.

OKAMOTO, I.; ARNAUD, D.; LE BACCON, P.; OTTE, A. P.; DISTECHE, C. M.; AVNER, P.; HEARD, E. Evidence for de novo imprinted X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. *Nature*, 2005 (Letter)

PANARACE, M.; AGUERO, J. I.; GARROTE, M.; JAUREGUI, G.; SEGOVIA, A.; CANE, L.; GUTIERREZ, J.; MARFIL, M.; RIGALI, F.; PUGLIESE, M.; YOUNG, S.; LAGIOIA, J.; GARNIL, C.; FORTE PONTES, J. E.; ERENO JUNIO, J. C.; MOWER, S.; MEDINA, M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology*, v. 67, p. 142–151, 2007.

PARK, E. S.; HWANG, W. S.; JANG, G.; CHO, J. K.; KANG, S.K.; LEE, B. C.; HAN, J. Y.; LIM, J. M. Incidence of apoptosis in clone embryos and improved development by treatment of donor somatic cells with putative apoptosis inhibitors. *Molecular Reproduction and Development*, v. 68, p. 65–71, 2004.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. MCP como um Mecanismo de Lesão nas Doenças Hepatobiliares. *Arq. Gastroenterolgy.*, v. 38, p. 138-144, 2001.

PENG, X.; MARUO, T.; MATSUO, H.; TAKEKIDA, S.; DEGUCHI, J. Serum deprivation-induced apoptosis in cultured porcine granulosa cells is characterized by increased expression of p53 protein, Fas antigen and Fas ligand and by decreased expression of PCNA. *Endocr J.*, v. 45, p. 247– 253, 1998.

PEREZ, G. I.; TAO, X. J.; TILLY JL. Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, v.5(5), p. 414-20, 1999.

PESCE, M.; SCHOLER, H. R. Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*, v. 19, p. 271-278, 2001.

POLEJAEVA, I.A.; CAMPBELL, K.H.S. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. *Theriogenology*, v.53, p.117-126, 2000.

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

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

ROBL, J. M.; PRATHER, R.; BARNES, F. EYESTONE, W.; NORTHEY, D.; GILLIGAN, B.; FIRST, N. L. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, v. 64, p. 642-647, 1987.

ROBL, J. M. Application of Cloning Technology for Production of Human Polyclonal Antibodies in Cattle. *Cloning and Stem Cells*, v. 9, p.12-16, 2007.

ROTH, Z. e HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in Disruption of Developmental Competence of Bovine Oocytes by Heat Shock During Maturation. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 1898-1906, 2004.

SAMRAJ, A. K.; SOHN, D.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; SCHMITZ, I. Loss of caspase-9 reveals its essential role for caspase-2 activation and mitochondrial membrane depolarization. *Mol. Biol. Cell.*, v. 18(1), p. 84-93, 2007.

SANTOS, F.; ZAKHARTCHENKO, V.; STOJKOVIC, M.; PETERS, A.; JENUWEIN, T.; WOLF, E.; REI, W.; DEAN, W. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr. Biol.*, v. 13, p. 1116-1121, 2003.

SANTOS, F.; DEAN, W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction*, v. 127, p. 643-651, 2004.

SCHINIEKE, A. E.; KIND, A. J.; RITCHIE, W. A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A. R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. Human factor XI transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, v.278, p.2130-2133, 1997.

SEBASTIANO, V.; GENTILE, L.; GARAGNA, S.; REDI, C. A.; ZUCCOTTI, M. Cloned pre-implantation mouse embryos show correct timing but altered levels of gene expression. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 70, p. 146–154, 2005.

SHI, D.; LU, F.; WEI, Y.; CUI, K.; YANG, S.; WEI, J.; LIU, Q. Buffalos (*Bubalus Bubalis*) Cloned by Nuclear Transfer of Somatic Cells. *Biol. Reprod.*, v. 77, p. 285-291, 2007.

SHI, W.; ZAKHARTCHENKO, V.; WOLF, E. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation*, v. 71, p. 91-113, 2003.

SHIN, T.; KRAEMER, D.; PRYOR, J.; LIU, L.; RUGILA, J.; HOWE, L.; BUCK, S.; MURPHY, K.; LYONS, L.; WESTHUSIN, M. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, v.415, p.859, 2002.

SIMS, M.; FIRST, N. L. Production of calves by nuclear transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 91, p. 6143-6147, 1994.

SLIMANE-BUREAU, W. C.; KING, W. A. Chromosomal abnormalities: a potential quality issue for cloned cattle embryos. *Cloning and Stem Cells*, v. 4, p. 319-329, 2002.

SMAILI, S. S.; HSU, Y. T.; SANDERS, K. M.; RUSSELL, J. T.; YOULE, R. J. Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Death Differ.*, v.8(9), p. 909-20, 2001.

SMITH, L. C.; WILMUT, I.; HUNTER, R. H. Influence of cell cycle stage at nuclear transplantation on the development in vitro of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, v. 84, p. 619-624, 1988.

SMITH, L. C.; BORDIGNON, V.; BABKINE, M.; FECTEAU, G.; KEEFER, C. Benefits and problems with cloning animals. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 41, p. 919-924, 2000.

SMITH, L. C.; MURPHY, B. D. Genetic and epigenetic aspects of cloning and potential effects on offspring of cloned mammals. *Cloning Stem Cells*, v. 6, p. 126-132, 2004.

SPAN, L. F.; PENNING, A. H.; VIERWINDEN, G.; BOEZEMAN, J. B.; RAYMAKERS, R. A.; DE WITTE, T. The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique. *Cytometry*, v. 1;47, p. 24-31, 2002.

STICE, S. L.; GIBBONS, J.; RZUCIDLO, S. J.; BAILE, C. A. Improvements in nuclear transfer procedures will increase commercial utilization of animal cloning. *J. Anim. Sci.* v.13, p. 856-860, 2000.

STOJKOVIC, M.; BÜTTNER, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; RIEDL, J.; REICHENBACH, H. D.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; WOLF, E. Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture: comparison of in vivo derived, in vitro produced, nuclear transfer and demi-embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 55(3-4), p. 151-62, 1999.

SUSIN, S. A.; LORENZO HK, ZAMZAMI N, MARZO I, SNOW BE, BROTHERS GM, MANGION J, JACOTOT E, COSTANTINI P, LOEFFLER M, LAROCLETTE N, GOODLETT DR, AEBERSOLD R, SIDEROVSKI DP, PENNINGER JM, KROEMER G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, v. 397, p.441-6, 1999.

SUTEEVUN, T.; PARNPAI, R.; SMITH, S. L.; CHANG, C. C.; MUENTHAISON, S.; TIAN, X. C. Epigenetic characteristics of cloned and in vitro-fertilized swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *J. Anim. Sci.*, v. 84, p. 2065-2071, 2006.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NATIRA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, v. 131, p. 861–872, 2007.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 9, p. 231-241, 2008.

THORBURN, A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal.*, v. 2, p. 139-144, 2004.

VAN-THUAN, N.; WAKAYAMA, S.; KISHIGAMI, S.; OHTA, H.; HIKICHI, T.; MIZUTANI, E.; BUI, H. T.; WAKAYAMA, T. Injection of somatic cell cytoplasm into oocytes before intracytoplasmic sperm injection impairs full-term development and increases placental weight in mice. *Biol. Reprod.*, v. 74(5), p. 865-73, 2006.

VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T. T.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open-pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, v. 52, p. 939-948, 1999.

VAJTA, G.; GJERRIS. Science and technology of farm animal cloning: State of the art. *Animal Reproduction Science*, v. 92, p. 211-230, 2006.

WAKAYAMA, T.; RODRIGUEZ, I.; PERRY, A. C.; YANAGIMACHI, R.; MOMBAERTS, P. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 96, p. 14984-14989, 1999.

WALL, R. J.; POWELL, A. M.; PAAPE, M. J.; KERR, D. E.; BANNERMAN, D. D.; PURSEL, V. G. WELLS, K. D.; TALBOT, N.; HAWK, H. W. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Biotechnology*, v. 23, p. 445-451, 2005.

WARNER, C. M.; EXLEY, G. E.; MCELHINNY, A. S.; TANG, C. Genetic regulation of preimplantation mouse embryo survival. *J. Exp. Zool.*, v. 282, p. 272-9, 1998.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R.; VIVANCO, W. H. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of Enderby Island cattle breed. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 10, p. 369-378, 1998.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.*, v.60, p. 996-1005, 1999.

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

WILMUT, I.; CAMPBELL, K. H. S.; O'NEILL, G. T. Sources of Totipotent Nuclei Including Embryonic Stem Cells. *Symposium on Cloning Mammals by Nuclear Transfer, Colorado State University, Colorado*. p. 8-16, 1992.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KING, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v. 385, p. 810-813, 1997.

WRENZYCKI, C.; WELLS, D.; HERRMANN, D.; MILLER, A.; OLIVER, J.; TERVIT, R.; NIEMANN, H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol. Reprod.*, v.65, p.309-317, 2001.

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

WUENSCH, A.; HABERMANN, F. A.; KUROSAKA, S.; KLOSE, R.; ZAKHARTCHENKO, V.; REICHENBACH, H. D.; SINOWATZ, F.; MAC LAUGHLIN, K. J.; WOLF, E. Quantitative monitoring of pluripotency gene activation after somatic cloning in cattle. *Biol. Reprod.*, v. 76, p. 983-991, 2007.

WUU, Y. D.; PAMPFER, S.; BECQUET, P.; VANDERHEYDEN, I.; LEE, K. H.; DE HERTOOGH, R. Tumor necrosis factor alpha decreases the viability of mouse blastocysts in vitro and in vivo. *Biol Reprod.* v. 60, p. 479-83, 1999.

XUE, F.; TIAN, X. C.; DU, F.; KUBOTA, C.; TANEJA, M.; DINNYES, A.; DAI, Y.; LEVINE, H.; PEREIRA, L. V.; YANG, X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nature Genetics*, v. 31, n. 2, p. 216-220, 2002.

YAMAZAKI, Y.; FUJITA, T. C.; LOW, E. W.; ALARCO´N, V. B.; YANAGIMACHI, R.; MARIKAWA, Y. Gradual DNA Demethylation of the Oct4 Promoter in Cloned Mouse Embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 73, p. 180-188, 2006.

YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* v. 70, p. 159-169, 2002.

YANG, X.; SMITH, S. L.; TIAN, X. C.; LEWIN, H. A.; RENARD, J. P.; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nature Genetics*, v. 39, n. 3, p. 295-302, 2007.

YAO, N.; WAN, P. C.; HAO, Z. D.; GAO, F. F.; YANG, L.; CUI, M. S.; WU, Y.; LIU, J. H.; LIU, S.; CHEN, H.; ZENG, S. M. Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 44(1), p. 132-9, 2009.

YOSHIDA, M.; USUI, T.; TSUJIMURA, K.; INAGAKI, M.; BEPPU, T.; HORINOUCI, S. Biochemical differences between staurosporine-induced apoptosis and premature mitosis. *Exp. Cell. Res.*, v. 232, p. 225-39, 1997.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology e Therapeutics*, v. 92, p. 57– 70, 2001.

ZAO, J.; ZHOU, Q.; WIEDMER, T.; SIMS, P. J. Level of Expression of Phospholipid Scramblase Regulates Induced Movement of Phosphatidylserine to the Cell Surface. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 6603–6606, 1998.

ZAKHARTCHENKO, V.; DURCOVA-HILLS, G.; STOJKOVIC, M.; SCHERNTHANER, W.; PRELLE, K.; STEINBORN, R.; MÜLLER, M.; BREM, G.; WOLF, E. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J. Reprod. Fertil.* v. 115, p. 325-31, 1999.